

Glutamattransport und exzitatorische synaptische Transmission im medialen entorhinalen Cortex.

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Biol. Claudia Iserhot
geboren am 21. Juli 1972 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. J. Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. B. Ronacher

Gutachter/innen:

1. PD Dr. M. Hennig
2. Prof. Dr. U. Heinemann
3. Prof. Dr. A. Herz

eingereicht: 07.02.2001

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2001

Abstract

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem der Säugetiere. Die präzise Kontrolle des extrazellulären Glutamatspiegels ist für eine normale synaptische Transmission wichtig und erforderlich, um die Neurone vor Exzitotoxizität zu schützen. Im Gehirn sorgen vor allem verschiedene hochaffine Na^+ -abhängige Glutamattransporter für diese Kontrolle. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, welchen Einfluß die Inhibition der Glutamattransporter auf die exzitatorische synaptische Transmission in Schicht III, einer Region in der bei Alzheimer-Demenz, Schizophrenie und Epilepsie häufig Zellschädigungen und Zellverluste beobachtet werden, und Schicht V des medialen entorhinalen Kortex (mEC) hat.

Extrazelluläre Messungen in den Schichten III und V der Ratte zeigten, daß die verwendeten Transport-Inhibitoren signifikant die negativen Feldpotentialkomponenten beider Schichten reduzierten. Schichtspezifische Unterschiede konnten dabei nicht festgestellt werden, was auf eine ähnliche Glutamatregulation in beiden Schichten schließen läßt. Für die anschließenden intrazellulären und patch-clamp Messungen wurden aus diesem Grund nur noch Neurone der Schicht III untersucht.

Beide Transport-Inhibitoren (*L-trans*-2,4-PDC und DL-TBOA) reduzierten die Amplituden der pharmakologisch isolierbaren EPSPs/EPSCs ohne die Kinetik zu beeinflussen. Diese reduzierende Wirkung konnte durch *trans*-(\pm)-ACPD, einen Agonisten der Gruppe I und II metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluRs), nachgeahmt werden. Die Vorinkubation der Hirnschnitte mit dem unspezifischen Gruppe I und II mGluR-Antagonisten MCPG verhinderte die durch *trans*-(\pm)-ACPD hervorgerufene Amplitudenreduktion und auch den reduzierenden Effekt der beiden Transport-Inhibitoren. In nachfolgenden Experimenten mit dem spezifischen Gruppe II mGluR-Antagonisten EGLU konnte dieser zwar die durch *L-trans*-2,4-PDC hervorgerufene Wirkung verhindern, nicht aber den durch DL-TBOA vermittelten Effekt, was auf eine Aktivierung von Gruppe I mGluRs hinweist. Zusätzlich führte die Applikation von DL-TBOA zu einer signifikanten Veränderung des Doppelpuls-Index, was auf einen präsynaptischen Wirkmechanismus hinweist. Die Applikation von *L-trans*-2,4-PDC hingegen hatte keinen Effekt auf den Doppelpuls-Index.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, daß beide Transport-Inhibitoren die erregende synaptische Transmission über eine Aktivierung präsynaptischer metabotroper Glutamatrezeptoren der Gruppen I und II hemmen. Dabei konnte festgestellt werden, daß diese Hemmung unter Applikation von DL-TBOA die präsynaptische Transmitterausschüttung über einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch Aktivierung von Gruppe I mGluRs vermindert, während *L-trans*-2,4-PDC seine Wirkung vor allem über eine Aktivierung der Gruppe II vermittelt. Dabei kann davon ausgegangen werden, daß *L-trans*-2,4-PDC in der benutzten Konzentration die mGluRs der Gruppe II direkt aktivieren kann und der Effekt nicht nur präsynaptisch vermittelt wird.

Schlagworte:

entorhinaler Kortex, Glutamattransport, negative Rückkopplung, mGluR

Abstract

Glutamate is the primary excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system. The precise control of extracellular glutamate is crucial for the maintenance of normal synaptic transmission and the prevention of excitotoxicity. High-affinity glutamate transporters ensure termination of glutamatergic neurotransmission and keep the synaptic glutamate concentration below excitotoxic levels. In layer III, a region that is especially prone to cell damage in Alzheimer's disease, schizophrenia and epilepsy, and layer V of the medial entorhinal cortex (mEC) effects of blocking glutamate uptake on excitatory synaptic transmission were studied.

Extracellular recordings in rat brain slices revealed that application of glutamate uptake inhibitors significantly reduced stimulus-induced negative field potentials in both, layer III and V of the mEC. This effect showed no significant differences in both layers suggesting a similar glutamate regulation in layer III and V. Therefore, only layer III neurons of the mEC were used for the subsequent intracellular and patch-clamp recordings.

Two competitive glutamate transporter antagonists, DL-TBOA and L-*trans*-2,4-PDC, reduced the amplitude of pharmacologically isolated EPSPs/EPSCs without changing the time course of the events. This effect was mimicked by *trans*-(±)-ACPD, an agonist of group I and II metabotropic glutamate receptors (mGluRs). The competitive group I and II mGluR antagonist MCPG blocked the depression of the EPSC amplitude induced by *trans*-(±)-ACPD and also masked the effect of either DL-TBOA or L-*trans*-2,4-PDC. Furthermore, EGLU, which selectively antagonizes group II mGluRs, masked the effect of L-*trans*-2,4-PDC but not that of DL-TBOA, indicating an involvement of group I mGluRs in the latter case. Finally, DL-TBOA significantly enhanced the paired-pulse index, suggesting a presynaptic mechanism for the depression of EPSP/EPSC amplitude, whereas application of L-*trans*-2,4-PDC had no significant effect on the paired-pulse behaviour.

The present study shows that both transport inhibitors depress pharmacologically isolated EPSPs/EPSCs in layer III neurons of the mEC in combined entorhinal-hippocampal slices. This effect seems to be mediated via activation of different groups of mGluRs. The results suggest that DL-TBOA causes a negative feedback on glutamate release via indirect activation of presynaptic group I mGluRs, possibly due to an accumulation of glutamate, whereas application of L-*trans*-2,4-PDC most likely leads to an activation of presynaptic group II mGluRs reducing Ca²⁺-independent release. The latter might be due to a direct action of L-*trans*-2,4-PDC at these receptors. The present data suggest that blockade of glutamate transport in the mEC does not lead to an excessive accumulation of glutamate because of a counteractive autoinhibiting mechanism.

Keywords

entorhinal cortex, glutamate transporter, negative feedback, mGluR

Erklärung

Entsprechend der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 10/1997 vom 4. April erkläre ich, daß

- ich mich an keinem anderen Ort um einen Doktorgrad beworben habe oder bereits einen solchen besitze,
- mir die genannte Promotionsordnung bekannt ist,
- ich die vorliegende Arbeit selbständig erarbeitet und verfaßt habe und hierfür ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Claudia Iserhot

Berlin, den 7. Februar 2001

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne die maßgebliche Hilfe und Unterstützung vieler Menschen nicht möglich gewesen. Mir bleibt an dieser Stelle, ihnen allen zu danken.

Herrn Prof. Dr. Heinemann danke ich für seine Einladung zur Mitarbeit in der neurowissenschaftlichen Forschung und sein immerwährendes Vertrauen in meine Arbeit. Mein besonderer Dank gilt den Herren PD Dr. Hennig und Prof. Dr. Herz für die aufmerksame Unterstützung meiner Arbeit und ihre gutachterlichen Mühen. Herrn Dr. Körner (MEMOREC Stoffel GmbH, Köln) für die freundliche Überlassung der EAAC1-knockout-Mäuse.

Den Damen und Herren Privatdozenten Doris Albrecht, Denise Manahan-Vaughan, Tengis Gloveli und Andreas Draguhn, den Doktores Katrin Bernöster, Katrin Schulze, Patricia Hoffmann, Katharina Buchheim, Christine Gebhardt, Dietmar Schmitz, Oliver von Bohlen und Halbach und Sebastian Schuchmann sowie den werdenden Doktores Andrea Baarke, Tamara Dugladze, Florian Weissinger, Jörg Breustedt, Tom Schilling und Alexander Kulla danke ich für

- (i) die stets spannende Zusammenarbeit
- (ii) die immerwährende moralische und berufliche Unterstützung sowie
- (iii) den vorwiegend herrschenden Spaß im Institut.

Ein spezielles Dankeschön geht an Herrn Dr. Siegmund für die computertechnische Unterstützung. Er war immer zur Stelle, wenn der Computer meine Forderungen nicht erfüllen wollte und hat mir durch seine Programmierkünste zu einem wunderschönen Auswerteprogramm verholfen und mir damit unzählige Stunden mühsamer manueller Auswertung erspart. Weiterhin an Herrn Dr. Gabriel für die ständige Bereitschaft, mir bei jeglichen technischen Problemen mit Rat und Tat hilfreich zur Seite zu stehen; an Frau Lindner, die immer noch einen Platz für mich im überfüllten Terminkalender des Chefs gefunden hat; an Astrid Düerkop, ohne die ich vermutlich nie an eine Vielzahl wichtiger Veröffentlichungen herangekommen wäre und die immer genau wußte, wie oft ich noch 'verreisen' darf und an Antje Piechotta, für die unzähligen kleinen und großen technischen Hilfestellungen. Auch allen anderen nicht genannten Mitarbeitern des Johannes-Müller-Institutes für Physiologie sei für ihre Unterstützung gedankt.

Meinen unermüdlichen Freunden Katrin & Thomas Bernöster, Viola & Oliver von Bohlen und Halbach, Andrea Baarke, Katrin Lind, Patricia Hoffmann, Stefan Pick und Jason Kerr schulde ich besonderen Dank für ihre Geduld und den Wein. Ich wünsche Euch, daß ihr nie wieder meinen ruhelosen, fahrigen Stunden, seltsamen Gesprächsthemen und unvermittelt auftauchenden Verzweiflungsanfällen ausgesetzt seid.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester und deren Familien für ihr Interesse und ihre Unterstützung während meiner Arbeit und in allen sonstigen Lebenslagen bedanken. Danke, daß ihr mich auf diesen Weg gebracht habt!

Für alle meine Eltern!

Inhaltsverzeichnis

Erklärung	iii
Danksagung	iv
Inhaltsverzeichnis	vii
Tabellenverzeichnis	xi
Abbildungsverzeichnis	xii
Abkürzungen	xiv
1 Einleitung	1
1.1 Synaptische Transmission	2
1.2 Glutamatrezeptoren	3
1.2.1 Ionotrope GluRs	3
1.2.2 Metabotrope GluRs	5
1.3 Intrinsische Zelleigenschaften	7
1.4 Glutamataufnahmesysteme	8
1.4.1 Die Familie der Na ⁺ -abhängigen Glutamattransporter	9
1.4.1.1 Klonierung der Subtypen	9
1.4.1.2 Ionen-Abhängigkeit und Kanaleigenschaften der Transporter	10
1.4.1.3 Regionale und zelluläre Lokalisation der Transporter-Subtypen	12
1.4.2 Expression der Transporter in peripheren Geweben	14
1.4.3 Entwicklungsbedingte Expression der Transporter-Subtypen	15
1.5 Anatomie des entorhinalen Cortex	16
1.5.1 Extrinsischer Schaltkreis zwischen entorhinalem Cortex und Hippocampus	17
1.6 Ziele dieser Arbeit	19

2 Material & Methodik	22
2.1 Versuchstiere	22
2.2 Hirnschnittpräparation	22
2.3 Meßkammer	23
2.4 Meßanordnung	24
2.4.1 Reizelektroden	25
2.4.2 Referenzelektroden	25
2.5 Lösungen und Pharmaka	26
2.5.1 Perfusionslösung	26
2.5.2 Pharmaka	26
2.6 Elektrophysiologische Untersuchungen	27
2.6.1 Extrazelluläre Messungen	27
2.6.1.1 Experimentelles Protokoll	27
2.6.1.2 Feldpotential-Elektroden	28
2.6.1.3 Analyse der Feldpotentiale	28
2.6.2 Intrazelluläre Messungen	29
2.6.2.1 Voltage-Clamp und diskontinuierlicher Verstärker	29
2.6.2.2 Intrazelluläre Elektroden	31
2.6.2.3 Exzitatorische Postsynaptische Potentiale (EPSPs) und Ströme (EPSCs)	31
2.6.2.4 Experimentelles Protokoll	32
2.6.2.5 Analyse der EPSCs	33
2.6.3 Die Patch-Clamp-Ableitungen	34
2.6.3.1 Patch-Clamp-Elektroden	34
2.6.3.2 Spontane exzitatorische Miniaturströme (mEPSCs)	34
3 Ergebnisse	36
3.1 Feldpotentiale der Ratte	36
3.1.1 Einfluß der Glutamat-Uptake-Inhibitoren auf evozierte Feldpotentiale der Schichten III und V des mEC	36

3.1.1.1	Dihydrokainat	36
3.1.1.2	L- <i>trans</i> -Pyrrolidine-2,4-Dicarboxylat	39
3.2	Intrazelluläre Ableitungen an Neuronen der Ratte	41
3.2.1	Einfluß von L- <i>trans</i> -2,4-PDC auf Neurone der Schicht III des medialen entorhinalen Cortex	41
3.2.1.1	Intrinsische Eigenschaften	41
3.2.1.2	Einfluß auf die exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSCs)	43
3.2.1.3	Einfluß auf AMPA- und NMDA-EPSCs nach Doppelpuls-Reizung	44
3.2.2	Einfluß der kombinierten Applikation von MCPG und L- <i>trans</i> -2,4-PDC auf Neurone der Schicht III des medialen entorhinalen Cortex	45
3.2.2.1	Eigeneffekt von MCPG	45
3.2.2.2	Einfluß auf die EPSCs nach kombinierter Applikation	47
3.2.3	Einfluß des Gruppe I/II mGluR-Agonisten <i>trans</i> -(±)-ACPD auf Neurone der Schicht III des medialen entorhinalen Cortex	48
3.2.3.1	Intrinsische Eigenschaften	48
3.2.3.2	Einfluß auf AMPA- und NMDA-vermittelte EPSCs	49
3.2.3.3	Einfluß auf AMPA- und NMDA-EPSCs nach Doppelpuls-Reizung	51
3.2.4	Einfluß der kombinierten Applikation von MCPG und <i>trans</i> -(±)-ACPD auf Neurone der Schicht III des medialen entorhinalen Cortex	51
3.2.4.1	Einfluß auf AMPA- und NMDA-vermittelte EPSCs	51
3.2.5	Kombinierte Applikation von L- <i>trans</i> -2,4-PDC und des Gruppe II mGluR-Antagonisten EGLU auf Neurone der Schicht III des mEC	52
3.2.5.1	Eigeneffekt von EGLU	52
3.2.5.2	Einfluß auf die gemischten EPSCs	53
3.2.6	Einfluß von L- <i>trans</i> -2,4-PDC auf spontane exzitatorische Miniaturströme	54
3.2.7	Einfluß von <i>threo</i> -β-Benzylxyaspartat auf gemischte EPSPs	55
3.2.7.1	Einfluß von DL-TBOA auf die AMPA-EPSCs nach Einzel- und Doppelpuls-Stimulation	56
3.2.7.2	Kombinierte Applikation von MCPG und DL-TBOA nach Einzel- und Doppelpuls-Stimulation	57
3.2.7.3	Kombinierte Applikation von EGLU und DL-TBOA	58
3.3	Extrazelluläre Messungen an Wildtyp- und EAAC1-knockout-Mäusen	59

3.3.1	Vergleich der Feldpotentiale der Schichten III und V von Wildtypen und Knockouts	59
3.3.2	Einfluß von L- <i>trans</i> -2,4-PDC auf die Feldpotentiale der Schicht III	61
3.3.3	Einfluß von DL-TBOA auf die Feldpotentiale der Schichten III und V des mEC von Wildtyp- und Knockout-Mäusen	63
4	Diskussion	65
4.1	Wirkung der Glutamat-Transport-Inhibitoren auf die Feldpotentiale der Ratte	65
4.2	Einfluß der verschiedenen Substanzen auf die Neurone der Schicht III des mEC der Ratte	68
4.2.1	Einfluß auf intrinsische Zelleigenschaften	69
4.2.2	Einfluß auf die synaptische Erregung im mEC der Ratte	70
4.3	Mechanismen der Inhibition	74
4.3.1	Kopplung an G-Proteine und intrazelluläre Botenstoffe	74
4.3.2	Involvierte Ionenkanäle	75
4.4	Wirkung der Glutamat-Transport-Inhibitoren auf die Feldpotentiale von Wildtyp- und EAAC1-knockout-Mäusen	78
4.5	Ausblick – Glutamattransporter und Krankheiten des ZNS	81
5	Zusammenfassung	83
6	Literatur	86
	Liste eigener Veröffentlichungen	109
	Vorträge	109

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Expressionsmuster der Transportersubtypen.	12
Tabelle 2 Pharmakologische Substanzen.	26
Tabelle 3 Experimentelles Protokoll für die extrazellulären Messungen.	27
Tabelle 4 Pharmakologische Substanzen zur Isolierung der einzelnen EPSCs.	31
Tabelle 5 Experimentelles Protokoll der intrazellulären Messungen.	32

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung der zwei Untertypen ionotroper Glutamaterezeptoren (AMPA/Kainat und NMDA).	4
Abb. 2	Beispiel für einen metabotropen Glutamaterezeptor.	6
Abb. 3	Schematische Modelle der Transporterfunktion.	11
Abb. 4	Dreidimensionale Ansicht des Rattenhirns.	17
Abb. 5	Schematische Darstellung der Verschaltung zwischen entorhinalem Cortex und Hippocampus.	19
Abb. 6	Präparation von horizontalen temporalen Hirnschnitten des Cortex.	23
Abb. 7	Schematische Darstellung der Ableitorte und des Reizortes für die extra- und intrazellulären Ableitungen.	25
Abb. 8	Darstellung eines Feldpotentials mit eingezeichneten Analyseorten.	28
Abb. 9	Schematische Darstellung eines EPSCs.	33
Abb. 10	Feldpotentialantworten der Schichten III und V bei maximaler Stimulation vor und nach der Applikation von 200 μ M DHK.	37
Abb. 11	Feldpotentialantworten der Schichten III und V bei maximaler Stimulation vor und nach der Applikation von 400 μ M DHK.	38
Abb. 12	Maximale Feldpotentialantworten der Schichten III und V vor und nach der Applikation von 200 μ M und 400 μ M <i>L-trans</i> -2,4-PDC.	40
Abb. 13	Intrinsische Zelleigenschaften nach der Applikation <i>L-trans</i> -2,4-PDC.	42
Abb. 14	Effekt von <i>L-trans</i> -2,4-PDC auf die Amplituden der AMPA- und NMDA-vermittelten EPSCs.	43
Abb. 15	Effekt von <i>L-trans</i> -2,4-PDC auf die Amplituden der Kainat-vermittelten und verbleibenden EPSCs.	44
Abb. 16	Einfluß von MCPG auf die EPSC-Amplituden.	46
Abb. 17	Effekt der kombinierten Applikation von MCPG & <i>L-trans</i> -2,4-PDC auf die Amplituden der AMPA- und NMDA-EPSCs.	47
Abb. 18	Intrinsische Zelleigenschaften nach Applikation von <i>trans</i> -(\pm)-ACPD.	48
Abb. 19	Effekt von <i>trans</i> -(\pm)-ACPD auf die Amplituden der AMPA- und NMDA-vermittelten EPSCs.	50
Abb. 20	Effekt der kombinierten Applikation von MCPG & <i>trans</i> -(\pm)-ACPD auf die Amplituden der AMPA- und NMDA-EPSCs.	51
Abb. 21	Kombinierte Applikation von EGLU und <i>L-trans</i> -2,4-PDC.	53

Abb. 22	Einfluß von <i>L-trans</i> -2,4-PDC auf die mEPSCs.	54
Abb. 23	Gemischte EPSPs vor und nach Applikation von DL-TBOA.	55
Abb. 24	DL-TBOA erhöht den PPI isolierter AMPA-vermittelter EPSCs.	57
Abb. 25	Kombinierte Applikation von MCPG und DL-TBOA.	58
Abb. 26	Kombinierte Applikation von EGLU und DL-TBOA.	59
Abb. 27	Feldpotentiale von Wildtyp- und EAAC1-knockout-Mäusen.	60
Abb. 28	Einfluß von <i>L-trans</i> -2,4-PDC auf die Feldpotentiale der Schicht III des Wildtypen.	61
Abb. 29	Einfluß von <i>L-trans</i> -2,4-PDC auf die Feldpotentiale der Schicht III der EAAC1-knockout-Maus.	62
Abb. 30	Maximale Feldpotentialantworten der Schichten III und V bei Wildtypen vor und nach der Applikation von 150 µM DL-TBOA.	63
Abb. 31	Maximale Feldpotentialantworten der Schichten III und V bei EAAC1-knockout-Mäusen vor und nach der Applikation von 150 µM DL-TBOA.	64
Abb. 32	Vermutete subsynaptische Anordnung der einzelnen ionotropen und metabotropen Glutamatrezeptoren sowie der Glutamattransporter.	68
Abb. 33	Glutamatfreisetzung kann durch umgekehrten Transport oder Heteroexchange erfolgen.	80

Abkürzungen

[Glu] _o	extrazelluläre Glutamatkonzentration
1 <i>S</i> /3 <i>R</i> -ACPD	(1 <i>S</i> /3 <i>R</i>)-1-Aminocyclopentane-1,3-Dicarboxylat, Agonist der Gruppe I und II mGluRs
4-AP	4-Aminopyridin, K ⁺ -Kanal-Blocker
ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (Liquor)
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-4-propionsäure
APV	2-Amino-5-phosphonovaleriansäure, NMDA-Rezeptorantagonist
ATP	Adenosintriphosphat
CA	Cornu ammonis
CGP 55845A	3-N-[1-(s)-(3,4-dichlorophenyl)ethyl]amino-2-(s)-hydroxypropyl-P-benzyl-phosphat, GABA _B -Antagonist
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione, non-NMDA-Rezeptorantagonist
DAG	Diacylglycerin
DCG-IV	(2 <i>S</i> ,2' <i>R</i> ,3' <i>R</i>)-2-(2',3'-Dicarboxycyclopropyl)glyzin, selektiver Gruppe II mGluR-Agonist
DHK	Dihydrokainat, nicht-kompetitiver Glutamatttransport-Inhibitor
DHPG	Dihydroxyphenylglyzin, selektiver Gruppe I mGluR-Agonist
DL-TBOA	<i>threo</i> -β-Benzoyloxyaspartat, nicht-kompetitiver Glutamatttransport-Inhibitor
EAA	exzitatorische Aminosäure
EAAC1	Excitatory Amino Acid Carrier 1, neuronaler Glutamatttransporter (EAAT3)
EAAT1-5	exzitatorische Aminosäuretransporter 1-5
EC	entorhinaler Cortex
EGLU	(2 <i>S</i>)-α-Ethylglutamat, selektiver Antagonist präsynaptischer Gruppe II mGluRs
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
GABA	γ-Aminobuttersäure
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter, glialer Glutamatttransporter (EAAT1)
GLT-1	Glutamat-Transporter 1, glialer Glutamatttransporter (EAAT2)

GluR	Glutamatrezeptor
I _{AHP}	Ca ²⁺ -abhängiger Kaliumstrom
iGluR	ionotroper Glutamatrezeptor
IP3	Inositoltriphosphat
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
KA	Kainat
L-AP4	L(+)-2-Amino-4-phosphonobutyrat, selektiver Gruppe III mGluR-Agonist
IEC	lateral entorhinaler Cortex
L- <i>trans</i> -2,4-PDC	L- <i>trans</i> -Pyrrolidine-2,4-Dicarboxylat, kompetitiver Glutamatttransport-Inhibitor
LY300164	3-N-substituted 2,3-benzodiazepin, selektiver AMPA-Antagonist
MCPG	(RS)- α -Methyl-4-carboxyphenylglycin, nicht-selektiver Gruppe I&II mGluR-Antagonist
mEC	medialer entorhinaler Cortex
mEPSC	spontane exzitatorische Miniaturströme
mGlu _{1/5}	Gruppe I mGluRs
mGlu _{2/3}	Gruppe II mGluRs
mGlu _{4/6-8}	Gruppe III, mGluRs
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
NBQX	2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[f]quinoxaline-7-sulphonamid, non-NMDA-Rezeptorantagonist
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
non-NMDA	AMPA/Kainat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PPI	Doppelpuls-Index
PSP	postsynaptisches Potential
PTX	Pertussis-Toxin
<i>trans</i> -(\pm)-ACPD	(\pm)-1-Aminocyclopentane- <i>trans</i> -1,3-Dicarboxylat, Agonist der Gruppe I und II mGluRs
TTX	Tetrodotoxin
ZNS	Zentrales Nervensystem

„So far as our present knowledge goes, we are led to think that the tip of a twig of the arborescence is not continuous with but merely in contact with the substance of the dendrite or cell body on which it impinges. Such a special connection of one nerve cell with another might be called a synapse.“

(C. S. Sherrington, 1897)

1 Einleitung

Nur wenige Begriffe haben mehr Bedeutung für die Neurowissenschaften, als die 1897 von Charles Sherrington (Sherrington, 1897) geprägte Bezeichnung 'Synapse' für die Verbindung zwischen zwei erregbaren Zellen. Während die Arbeit von Ramón y Cajal die anatomische Basis der modernen Neurowissenschaften bildete, wurden die Untersuchungen Sherringtons zur Grundlage physiologischer Prinzipien.

Die Vorstellung, daß die Kommunikation zwischen elektrisch erregbaren Zellen durch chemische Botenstoffe vermittelt wird, wurde erst später entwickelt. Die Existenz chemischer Botenstoffe wurde schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts von John Langley und Henry Dale auf der Basis ihrer pharmakologischen Studien vermutet. Der überzeugende Beweis wurde aber erst 1920 durch Otto Loewi und seine Versuche an zwei isolierten, schlagenden Froschherzen erbracht, in denen er nachwies, daß der Nervus vagus bei Stimulation eine Substanz freisetzt, welche die bekannte Vaguswirkung am Herzen hervorbringen kann (Loewi, 1921). Später konnte die Transmitterwirkung dieses Stoffes, inzwischen als Acetylcholin identifiziert, auch für die neuromuskuläre Endplatte gezeigt werden (Dale *et al.*, 1936), auch heute noch ein Basismodell für die Untersuchungen und Prinzipien synaptischer Transmission. Ausgehend von diesen und anderen Arbeiten stuft man auch heute noch eine Substanz erst dann als Neurotransmitter ein, wenn sie die folgenden Kriterien erfüllt:

1. Sie muß präsynaptisch in einem Neuron synthetisiert werden.
2. Nach Aktivierung des Neurons wird sie in Abhängigkeit vom Ca^{2+} -Einstrom freigesetzt und ruft eine bestimmte Wirkung an der postsynaptischen Zelle hervor.
3. Es sollte spezifische Mechanismen zur Entfernung der Substanz aus dem synaptischen Spalt geben.

4. Die Substanz und ihre Agonisten lösen postsynaptisch ein identisches Potential aus.
5. Die Wirkung der Agonisten läßt sich durch Antagonisten in gleichem Sinne unterdrücken wie das physiologische Signal (zitiert nach Kandel *et al.*, 2000 und Werman, 1966).

Bei der chemischen synaptischen Transmission kommt es nach dem Eintreffen des Aktionspotentials zur Depolarisation des präsynaptischen Neurons. Die Depolarisation aktiviert spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle der Axonendigung und Ca^{2+} tritt ein. Die gestiegene intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration löst die Exozytose von Transmitter enthaltenden Vesikeln aus, die ihren Inhalt in den synaptischen Spalt entleeren. Der Transmitter diffundiert zu den Rezeptormolekülen der postsynaptischen Membran und verbindet sich mit diesen. Diese Anheftung des Transmitters aktiviert Ionenkanäle und permeable Ionen tragen daraufhin einen postsynaptischen Strom entlang der elektrochemischen Gradienten. Dieser Strom bewirkt ein postsynaptisches Potential (PSP). Übertrifft diese postsynaptische Potentialänderung das Schwellenpotential kommt es zur Auslösung eines Aktionspotentials. Die chemische Übertragung kann sowohl hemmende (inhibitorisches postsynaptisches Potential, IPSP) als auch erregende (exzitatorisches postsynaptisches Potential, EPSP) Wirkungen haben.

1.1 Synaptische Transmission

Die Aminosäure Glutamat ist nicht nur eine wichtige Komponente verschiedener klassischer Stoffwechselwege (u.a. Gluconeogenese und Ammoniakentgiftung), sondern auch ein bedeutender exzitatorischer Neurotransmitter (Mayer & Westbrook, 1987). Zudem läßt sich durch Glutamatdecarboxylase aus Glutamat der inhibitorische Transmitter GABA (γ -Aminobuttersäure) synthetisieren. Tatsächlich ist Glutamat im Zentralen Nervensystem (ZNS) der Säugetiere der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter. Nach der Freisetzung diffundiert Glutamat in weniger als einer Millisekunde über den synaptischen Spalt, bindet an spezifische Glutamatrezeptoren (GluRs) und aktiviert das postsynaptische Neuron. Auf diesem Weg wird das chemische Signal integriert, in ein elektrisches Signal umgewandelt, und die Information weitergeleitet. Eine unkontrollierte, dauerhafte Aktivierung der nachgeschalteten Neurone und ihrer Rezeptoren wird über verschiedene Mechanismen verhindert. Die Beendigung der glutamatergen Transmission erfolgt hauptsächlich über passive Diffusion von Glutamat aus dem synaptischen Spalt sowie neuronale und gliale Glutamattransporter innerhalb 1 ms nach der Exozytose (Clements, 1996; Diamond & Jahr, 1997).

Die wichtigsten inhibitorischen Transmitter im Gehirn sind GABA und Glyzin. GABA kann zwei Rezeptortypen aktivieren: GABA_A-Rezeptoren bilden Cl⁻-Kanäle, während GABA_B-Rezeptoren über G-Proteine wirken und entweder die K⁺-Permeabilität erhöhen oder spannungsgesteuerte Ca²⁺-Kanäle blockieren. Eine Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren ermöglicht einen Cl⁻-Einstrom in die Zelle, der die Membran hyperpolarisiert. Das Öffnen dieser Kanäle erhöht zudem die Membranleitfähigkeit und schließt daher jeden exzitatorischen Strom kurz, der in die Zelle fließt.

Glyzin inhibiert die neuronale Aktivität durch eine Erhöhung der Cl⁻-Leitfähigkeit. Diese Leitfähigkeitserhöhung ist der durch GABA-vermittelten ähnlich (Hamill *et al.*, 1983; Kuhse *et al.*, 1995).

1.2 Glutamatrezeptoren

Die Rezeptoren der exzitatorischen Aminosäuren lassen sich in ionotrope (iGluRs) und metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluRs) einteilen. Bei den iGluRs führt die Bindung der Agonisten und von Glutamat direkt zur Aktivierung rezeptorassoziierter Ionenkanäle, während die Aktivierung der mGluRs mit einer intrazellulären biochemischen Kaskade verbunden ist, die letztendlich zum Öffnen oder Schließen membranärer Ionenkanäle führt.

1.2.1 Ionotrope GluRs

Die ionotropen Glutamatrezeptoren (Abb. 1) werden in NMDA- und non-NMDA-Rezeptoren (AMPA/Kainat) unterteilt. Diese Gruppierung basiert auf der Wirkung verschiedener exogener Agonisten: N-methyl-D-Aspartat (NMDA), α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-4-propionsäure (AMPA) und Kainat (McLennan, 1983; Watkins & Olverman, 1987; Westbrook, 1994). Aktuellere molekularbiologische Studien zeigen, daß diese drei Untergruppen durch verschiedene Gene verschlüsselt sind (Borges & Dingledine, 1998; Dingledine *et al.*, 1999; Hollmann & Heinemann, 1994; Seeburg, 1993). Dies sind GluR1-4 für AMPA-, GluR5-7, KA1 und KA2 für Kainat- und NR1, NR2A-D und NR3A für die NMDA-Rezeptoren (Barnes & Henley, 1992; Das *et al.*, 1998; Hollmann & Heinemann, 1994; Schoepfer *et al.*, 1994). Die Zusammensetzung dieser Untereinheiten bestimmt die biophysikalischen Eigenschaften der Rezeptoren und in unterschiedlichem Umfang auch deren Pharmakologie. So ist die Eigenschaft der AMPA-Rezeptoren, Ca²⁺-Ionen den Kanal passieren zu lassen von der Untereinheit GluR2 (auch GluRB) abhängig (Jonas *et al.*, 1994). Die Präsenz dieser Unterein-

heit verhindert die Passage von Ca^{2+} durch den offenen Kanal (Feldmeyer *et al.*, 1999; Jonas *et al.*, 1994; Jonas & Burnashev, 1995; Meldrum, 2000). AMPA-Rezeptoren weisen eine geringere Affinität für Glutamat auf als NMDA-Rezeptoren, haben jedoch eine schnellere Kinetik und vermitteln die schnelle, initiale Komponente der EPSPs. Die durch AMPA/Kainat-Rezeptoren vermittelten PSPs, werden durch einen uneinheitlich Anstieg der Kationen-Leitfähigkeit (vorwiegend Na^+ -Ionen und K^+ -Ionen) verursacht, so daß das Umkehrpotential bei ungefähr 0 mV liegt (Hollmann & Heinemann, 1994; MacDermott & Dale, 1987). Bei den non-NMDA-vermittelten PSPs ist die Zeit zwischen dem Eintreffen des Aktionspotentials in der präsynaptischen Terminale und der Auslösung des PSP sehr kurz und die resultierenden EPSPs steigen rasch an. Alle AMPA- und Kainat-Rezeptoren können durch die Antagonisten CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) und NBQX (1,2,3,4-tetrahydro-6-Nitro-2,3-dioxo-benzol[f]quinoxaline-7-sulfonamide) blockiert werden (Übersichtsartikel: Collingridge & Lester, 1989). Mit Hilfe neuerer Antagonisten (z.B. LY300164) wird versucht, selektiv AMPA-Rezeptoren zu blockieren. Dabei muß berücksichtigt werden, daß diese Substanzen fast immer auch noch eine Affinität zu den Kainat-Rezeptoren haben (Van Den *et al.*, 2000).

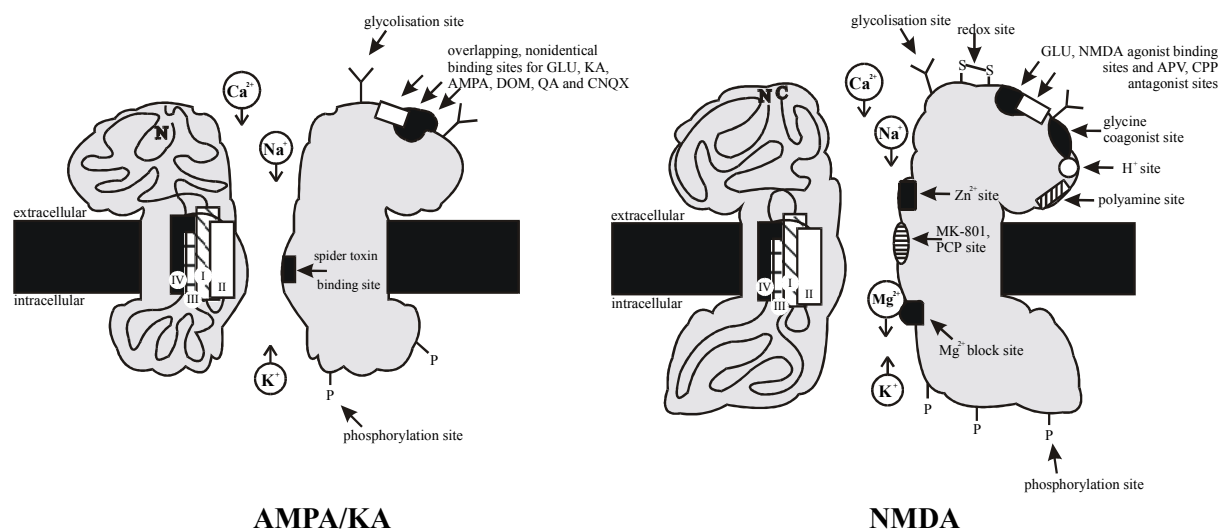


Abbildung 1

Schematische Darstellung der zwei Untertypen ionotroper Glutamaterezeptoren (AMPA/Kainat und NMDA). Gezeigt sind unter anderem die verschiedenen Bindungsstellen der Agonisten, Antagonisten, Modulatoren und anderer sekundärer Modifikationsstellen (nach Hollmann & Heinemann, 1994).

Im Gegensatz zu den schnellen, durch AMPA-Rezeptoren vermittelten, postsynaptischen Potentialen ist die durch NMDA-Rezeptoren vermittelte Wirkung von Glutamat komplizierter. NMDA-Rezeptoren haben eine höhere Ca^{2+} -Permeabilität als non-NMDA-Rezeptoren und werden spannungsabhängig durch Mg^{2+} -Ionen blockiert (Mayer & Westbrook, 1987). Zu-

sätzlich benötigen sie Glyzin (oder einen anderen Liganden) als Ko-Agonisten.(Ascher *et al.*, 1988; Ascher & Nowak, 1988; MacDermott *et al.*, 1986; Mayer *et al.*, 1984) So scheint jede Rezeptoreinheit zwei Glyzin- und zwei Glutamatbindungsstellen zu haben (Laube *et al.*, 1998). Für den NMDA-Rezeptor sind verschiedene Agonisten bekannt, die sich in kompetitive und nicht-kompetitive unterteilen lassen. Die wichtigsten kompetitiven Antagonisten sind dabei APV (DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid) und CPP (3-((±)-2-carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonate) (Collingridge & Lester, 1989). Bei den nicht-kompetitiven Antagonisten sind vor allem die Phencyclidine hervorzuheben. Ihre Bindungsstelle liegt innerhalb des Kanals und kann nach Aktivierung des NMDA-Rezeptors zum 'open-channel-block' führen (z.B. Olney & Farber, 1995; Thomson *et al.*, 1985).

Wie schon bei den non-NMDA-Rezeptoren spielt auch bei den NMDA-Rezeptoren die Zusammensetzung der Untereinheiten eine entscheidende Rolle. So ist bekannt, daß die NR1-Untereinheit in allen NMDA-Rezeptoren präsent ist, während die Verteilung der Untereinheiten NR2A-D variiert und für die Kanaleigenschaften sowie die Sensitivität gegenüber verschiedenen Antagonisten verantwortlich ist (Buller & Monaghan, 1997; Meldrum, 2000; Monyer *et al.*, 1994). So sind z. B. die Kombinationen NR1-NR2C und/oder NR1-NR2D weniger APV-sensitiv (Buller & Monaghan, 1997). Weitere Unterschiede zeigen sich vor allem bei Betrachtung des spannungsabhängigen Block durch Mg^{2+} -Ionen. Dabei zeigen die Kombinationen NR1-NR2A und NR1-NR2B eine wesentlich stärkere Spannungsabhängigkeit als die NR2C- oder NR2D- enthaltenden Kombinationen (Monyer *et al.*, 1994). Weitere Unterschiede zeigen sich vor allem in der Kinetik der verschiedenen Untergruppen. So ist die Abklingzeitkonstante der Kombination NR1-NR2A ungefähr 3-4 mal schneller als die der NR2B- und NR2C-enthaltenden Kombination und die Abklingzeitkonstante des NR1-NR2D-Kanals ist sogar 10-40 mal langsamer (Monyer *et al.*, 1994).

1.2.2 Metabotrope GluRs

Zusätzlich zu den schnellen EPSPs ist Glutamat auch in der Lage über die Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren (mGluRs) langsame EPSPs und IPSPs zu generieren. Metabotrope GluRs können einerseits direkt Ionenkanäle steuern (K^+ und Ca^{2+}) und andererseits G-Proteine aktivieren, die wiederum einen 'second messenger' einschalten. Sie besitzen sieben membrandurchspannende Domänen mit einer großen extrazellulären N-Terminale, auf der auch die Glutamatbindungsstelle lokalisiert ist (Abb. 2). Bis heute sind acht verschiedene mGluRs bekannt, die aufgrund ähnlicher Aminosäuresequenzen und Signaltransduktionswege

in drei Gruppen eingeteilt werden können. Metabotrope GluRs der Gruppe I (mGlu₁ und mGlu₅) stimulieren über ein G-Protein die Phosphatidylinositol-Hydrolyse und die Mobilisierung des intrazellulären Ca²⁺. Dabei wird durch das G-Protein die Phospholipase C angeregt, die wiederum ihr Substrat Phosphatidylinositol in zwei 'second messenger' spaltet: Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG). IP3 ist wasserlöslich und diffundiert in das Cytoplasma, wo es an einen Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Reticulums bindet und damit die Freisetzung von Ca²⁺ aus internen Speichern auslöst. DAG verbleibt vorwiegend in der Membran und aktiviert dort, zusammen mit für diesen Vorgang ebenfalls notwendigen Membranphospholipiden, die Proteinkinase C (PKC). Im Gegensatz dazu sind die mGluRs der Gruppen II (mGlu₂ und mGlu₃) und III (mGlu₄ und mGlu₆₋₈) negativ an die Adenylatcyclase gekoppelt und inhibieren dabei die durch Aktivierung stimulierender G-Proteine oder durch Applikation von Forskolin vermittelte Bildung von cAMP (Attwell *et al.*, 1993; Bortolotto & Collingridge, 1998; Conn & Pin, 1997; Miller *et al.*, 1994; Nakanishi *et al.*, 1998; Schoepp & Conn, 1993). In neueren Studien wird auch noch eine vierte Gruppe metabotroper Glutamaterezeptoren diskutiert, die an die Phospholipase D gekoppelt ist (Albani-Torregrossa *et al.*, 1999; Pastorini *et al.*, 1998; Pellegrini-Giampietro *et al.*, 1996).

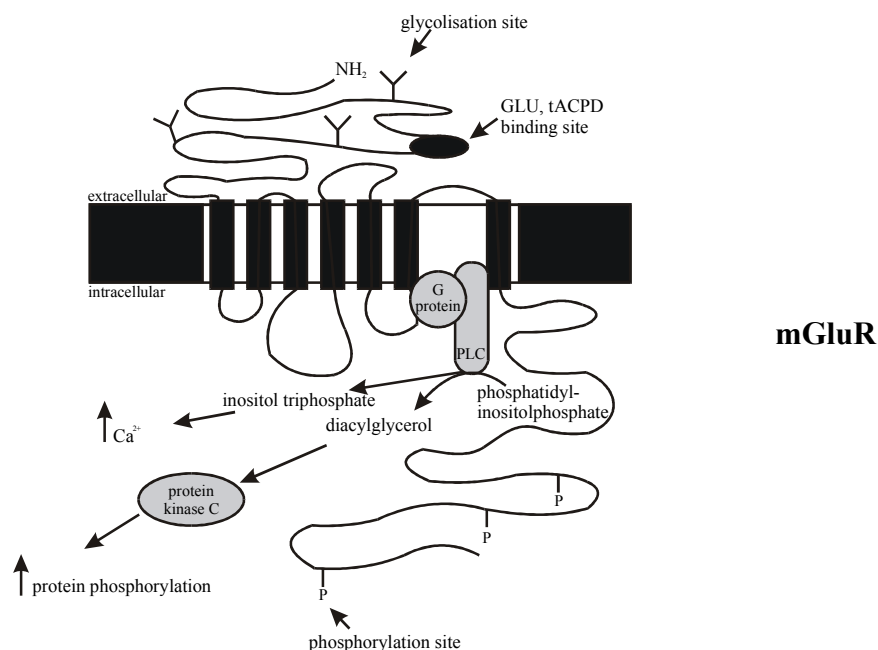


Abbildung 2

Beispiel für einen metabotropen Glutamaterezeptor der an die Proteinkinase C gekoppelt ist. PLC steht für Phospholipase C (aus: Hollmann & Heinemann, 1994).

1.3 Intrinsische Zelleigenschaften

Auf intrinsischer Ebene wird das Gleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung der Zelle durch verschiedene Ionenströme reguliert. Dabei ist an erster Stelle der erregenden Einwärtsströme der schnelle Na^+ -Strom ($I_{\text{Na,t}}$) zu nennen, der hauptsächlich für den steilen Aufstrich des Aktionspotentials verantwortlich ist (Stafstrom *et al.*, 1982). Weiterhin zählen zu den erregenden Einwärtsströmen der persistierende Na^+ -Strom ($I_{\text{Na,p}}$), der die Depolarisation erhöht, verschiedene Ca^{2+} -Ströme (I_{T} , I_{L} , I_{N} , I_{P}), die zu hochfrequenten Entladungen und Ca^{2+} -Spikes führen, sowie Ca^{2+} -abhängige, unspezifische Kationen-Ströme (Alzheimer *et al.*, 1993a; 1993b; Carbone & Swandulla, 1989; McCormick, 1998; Partridge & Swandulla, 1988).

Die hemmenden Kaliumströme lassen sich in vier große Gruppen einteilen: (1) die „rein“ spannungsaktivierten K^+ -Ströme, (2) ein durch muskarinische Agonisten regulierter, spannungsabhängiger K^+ -Strom und (3) verschiedene Ca^{2+} -abhängige Kaliumströme. Die Vertreter dieser drei Gruppen werden bei Depolarisation der Zellmembran aktiviert und generieren Auswärtsströme. Nur die Gruppe der einwärtsgerichtenden K^+ -Ströme (4) wird durch Hyperpolarisation aktiviert und verursacht Einwärtsströme.

Zu den rein spannungsaktivierten K^+ -Strömen zählen der Delayed-rectifier-Strom (I_{K}), der D-Strom (I_{D} oder $I_{\text{K,leak}}$) und der A-Strom (I_{A}). I_{K} wird nur bei starker Depolarisation aktiviert, hat eine langsame Inaktivierungskinetik (mehrere Sekunden) und spielt eine Rolle bei der Repolarisation des Aktionspotentials. I_{D} inaktiviert ebenfalls sehr langsam und leistet einen Beitrag zum Ruhemembranpotential der Zelle. Der schnell inaktivierende (20-100 ms) I_{A} führt zur Verzögerung des Aktionspotentials und trägt ebenso wie I_{D} zur Repolarisation des Aktionspotentials bei. I_{M} ist ein weiterer spannungsabhängiger Strom, der jedoch zusätzlich durch muskarinische Agonisten vollständig blockiert werden kann und nicht inaktiviert. Dieser Strom vermindert die neuronale Erregbarkeit und trägt über seine Beteiligung an einem verzögerten hyperpolarisierenden Nachpotential (mAHP) zur Regulation der Frequenzadaptation repetitiver Entladungen bei. Zu den Ca^{2+} -abhängigen Strömen zählen der repolarisierende K^+ -Strom (I_{C}) und I_{AHP} , der für die langsame Adaptation von Aktionspotentialen und die langsame Nachhyperpolarisation nach repetitiver Entladung verantwortlich ist. I_{h} wird durch Hyperpolarisation der Zelle aktiviert und beteiligt sich an rhythmischen Oszillationen (Mayer, 1985; McCormick, 1998). Zusätzlich existieren noch weitere, an G-Proteine gekoppelte, hemmende Auswärtsströme (Brown & Birnbaumer, 1990).

1.4 Glutamataufnahmesysteme

Im ZNS wird präsynaptisch freigesetztes Glutamat über Na^+ -abhängige Glutamattransporter (siehe unten) aus dem synaptischen Spalt entfernt und hauptsächlich von den Gliazellen aufgenommen (Bergles & Jahr, 1998; Tanaka *et al.*, 1997). Dort durchläuft es den „Glutamat-Glutamin-Zyklus“ (Fonnum, 1984), bei dem Glutamat durch das gliazellspezifische Enzym Glutaminsynthetase in Glutamin umgesetzt wird. Über den glialen Glutamintransporter System N (Brookes, 2000; Chaudhry *et al.*, 1999) wird es dann aus den Gliazellen freigesetzt, von Neuronen aufgenommen und steht dort zur Synthese von Glutamat zur Verfügung (Sonnwald *et al.*, 1997). Außerdem kann das in die Gliazellen aufgenommene Glutamat entweder durch die Aspartat-Amino-Transferase (AAT) transaminiert oder durch die Glutamat-Dehydrogenase oxidativ zu α -Ketoglutarat deaminiert werden. Letzteres tritt dann in den Tricarbonsäurecyclus ein und oxidiert zu CO_2 und Wasserstoff. Experimente am respiratorischen System des Hirnstammes konnten zeigen, daß die Blockade des Tricarbonsäurecyclus und der Glutaminsynthetase durch Fluoracetat den respiratorischen Rhythmus unterdrückt. Dieser Effekt konnte durch die zusätzliche Applikation von Glutamin wieder aufgehoben werden (Hülsmann *et al.*, 2000). Ein ähnlicher unterdrückender Effekt auf das respiratorische Netzwerk konnte in der gleichen Studie auch unter Applikation von Inhibitoren der glialen Glutamattransporter beobachtet werden.

Zusätzlich wurden auch noch Glutamat-Antiporter beschrieben, die Glutamat im Austausch für Cystin und andere saure Aminosäuren aus den Gliazellen exportieren und Na^+ -unabhängig sind (Bender *et al.*, 2000). Von besonderer Bedeutung ist dabei der Cystin-Glutamat-Antiporter, da Cystin für die Aufrechterhaltung des zellulären Glutathionspiegels wichtig ist. Glutathion schützt die Zellen vor oxidativem Streß und verschiedenen Toxinen (Meister & Anderson, 1983). Der Cystin-Glutamat-Antiporter gehört zum System X_C (Bender *et al.*, 2000) und wurde unter anderem in kortikalen Neuronen der Ratte (Murphy *et al.*, 1990) und Müller-Zellen der Retina (Pannicke *et al.*, 1994) beschrieben. Zusätzlich konnte von Reichelt *et al.* (1997) an den Müller-Zellen der Retina eine Abhängigkeit des Glutathionspiegels von den Na^+ -abhängigen Glutamattransportern (System X_{AG}) gezeigt werden. Glutamat wirkt in diesem Fall als limitierender Faktor für die Glutathionsynthese (Reichelt *et al.*, 1997).

Sowohl das gliale als auch das neuronale Aufnahmesystem sind in der Lage, Glutamat in erheblichem Maße anzureichern. Dies ermöglicht einen mehr als tausendfachen Konzentrationsgradienten für Glutamat zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum und hält die Transmitterkonzentration im synaptischen Spalt während einer Ruhephase unterhalb der Aktivie-

rungsschwelle für Glutamatrezeptoren ($< 1 \mu\text{M}$). Neuere Studien ergaben, daß die Bindung an die Transporter sehr rasch vonstatten geht, der eigentliche Transport aber relativ langsam ist, d.h., die Transporter benötigen $> 60 \text{ ms}$ zur Vollendung eines Zyklus (Lester *et al.*, 1996; Otis & Jahr, 1998). Demzufolge scheint es vor allem die Bindung von Glutamat an die Transporter zu sein, die - zumindest anfänglich - für die Beseitigung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt verantwortlich ist (Conti & Weinberg, 1999; Meldrum *et al.*, 1999).

1.4.1 Die Familie der Na^+ -abhängigen Glutamattransporter

1.4.1.1 Klonierung der Subtypen

Die Glutamattransporterbiologie erlebte einen enormen Aufschwung durch die zeitgleiche Klonierung der ersten drei eukaryotischen Glutamattransporter: GLAST (**G**lutamat-**A**spartat-Transporter, [Storck *et al.*, 1992]) und GLT-1 (**G**lutamat-Transporter 1, [Pines *et al.*, 1992]) aus Rattenhirn sowie EAAC1 (**E**xcitatory **A**mino **A**cid **C**arrier 1, [Kanai & Hediger, 1992]) aus Kaninchendünndarm. Vergleiche der cDNA-Sequenzen erbrachten eine ca. 50 %ige Ähnlichkeit und legten die Vermutung nahe, daß diese Transporter einer Genfamilie angehören. Mit der Isolierung der menschlichen Homologe (Arriza *et al.*, 1994; Kanai *et al.*, 1994; Manfras *et al.*, 1994; Shashidharan *et al.*, 1994; Shashidharan & Plaitakis, 1993) der drei Glutamattransporter schlugen Arriza *et al.* (1994) vor, diese Klone zur Vereinheitlichung der Nomenklatur EAAT1-3 (**E**xcitatory **A**mino **A**cid **T**ransporter) zu nennen. Aufgrund von Sequenzübereinstimmungen ist EAAT1 das menschliche Homolog zu GLAST, EAAT2 zu GLT-1 und EAAT3 zu EAAC1. Die Sequenzübereinstimmungen dieser drei Transporter erlaubten die Isolierung (*Homology-Screening*) weiterer Subtypen hochaffiner Glutamattransporter der Säugetiere: EAAT4 aus dem Cerebellum und EAAT5 aus der Retina und ebenso zweier neutraler Aminosäure-Transporter (Arriza *et al.*, 1993; 1997; Fairman *et al.*, 1995; Shafqat *et al.*, 1993). Ausgehend von der strukturellen Einzigartigkeit der Salamander-Retina und der Gelegenheit, die Rolle dieser Transporter in der synaptischen Physiologie dieses Systems zu studieren, wurden Salamander-Homologe der Transporter isoliert (Eliasof *et al.*, 1998). Inzwischen wurden auch Maus-Homologe gefunden und genetische Modelle entwickelt, in denen es möglich war, drei der inzwischen bekannten Transporter auszuschalten (Peghini *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1997; Watase *et al.*, 1998).

Die beginnende Entschlüsselung der Primärstruktur der Glutamattransporter liefert außerdem erste Informationen zu ihrer membranständigen Organisation und zu den funktionell

wichtigen Segmenten dieser Moleküle. Glutamattransporter sind integrale Membranproteine mit einer durchschnittlichen Polypeptidlänge von 550 Aminosäuren. Das Amino- und Carboxylende liegen intrazellulär, was eine gerade Anzahl von Membrandurchgängen vermuten läßt. Zur Zeit ist die exakte Anzahl der Membrandomänen noch nicht bekannt. Es werden zwei Topologiemodelle diskutiert, die in einem Fall von acht und im anderen Fall von zehn transmembranen Regionen ausgehen (Übersichtsartikel: Slotboom *et al.*, 1999). Darüber hinaus weisen alle klonierten Glutamattransporter mehrere Konsensussequenzen (Übereinstimmungen) für Phosphorylierungsstellen durch die Proteinkinasen C bzw. A auf und verfügen über mindestens zwei während der Evolution hoch konservierte N-Glykosylierungsstellen in der vermutlich zweiten extrazellulären Proteinschleife (Sims & Robinson, 1999).

1.4.1.2 Ionen-Abhängigkeit und Kanaleigenschaften der Transporter

Bei jedem Transporterzyklus wird positive Ladung über die Membran bewegt, so daß jeder Transport mit einem depolarisierenden Strom assoziiert ist. Diese Ladungsbewegung macht es möglich, mit Hilfe elektrophysiologischer Meßmethoden die Transporterströme einzelner Zellen (Bergles *et al.*, 1997; Mennerick & Zorumski, 1994; Otis *et al.*, 1997) zu studieren. Dieses Modell für den Transport von Glutamat schließt den Co-Transport von zwei bis drei Na^+ -Ionen und einem H^+ mit ein (Abb. 3A). Um den Zyklus abzuschließen, wird K^+ aus der Zelle transportiert (Zerangue & Kavanaugh, 1996).

Interessanterweise konnte beobachtet werden, daß einige Transportersubtypen mit einer Cl^- -Leitfähigkeit (vorrangig EAAT4 und EAAT5, [Meldrum *et al.*, 1999]) verbunden sind (Abb. 3B) und eine Hyperpolarisation bewirken. Dieser Cl^- -Strom wird rasch durch Glutamat aktiviert und ist Na^+ -abhängig (Fairman *et al.*, 1995; Wadiche *et al.*, 1995). Die Größe dieser Cl^- -Leitfähigkeit im Verhältnis zur Transporteraktivität kann bei den unterschiedlichen Transportern variieren (Arriza *et al.*, 1997). Es ist möglich, daß der Strom die Transportvermittelte Depolarisation ausgleicht und dadurch verhindert, daß es zu einer Depolarisations-induzierten Verminderung der Transporter-Aktivität kommt. Zudem könnte dieser Cl^- -Strom die durch Glutamat evozierten hyperpolarisierenden Antworten erklären, die in der Retina und im Cerebellum beobachtet wurden (Kataoka *et al.*, 1997; Otis *et al.*, 1997; Sonders & Amara, 1996).

In Gegenwart von Arachidonsäure kann Glutamat eine protonenselektive Leitfähigkeit in Oocyten aktivieren, in denen EAAT4 exprimiert wird (Fairman *et al.*, 1998). Vermutet wird, daß diese Transporter auch als Ionenkanäle arbeiten. Dies könnte auch Auswirkungen auf die

molekularen Modelle haben, die zur Erklärung der Transporterfunktionen dienen (Lester *et al.*, 1996).

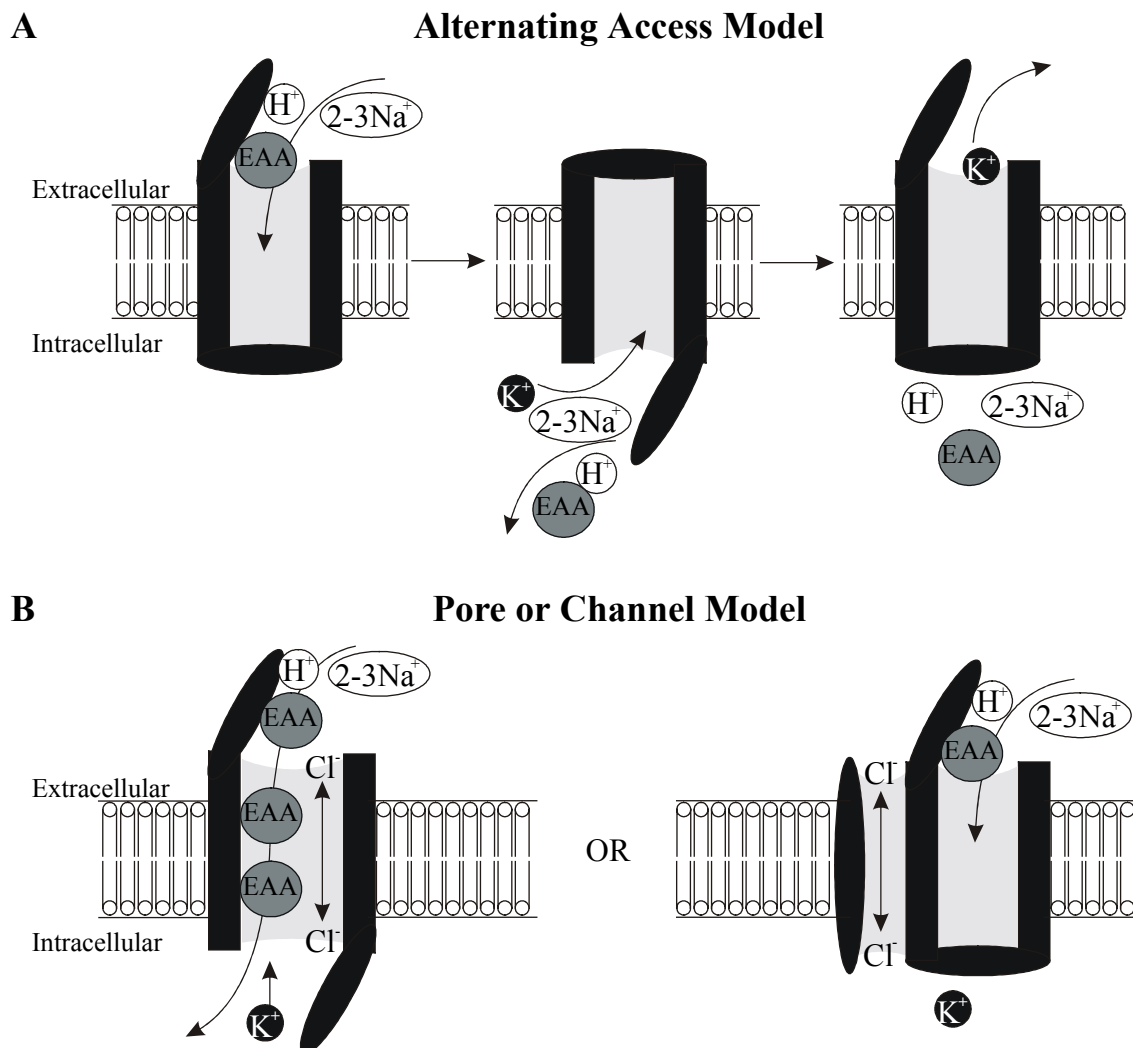


Abbildung 3

Schematische Modelle der Transporterfunktion. Biophysikalische Studien führten zu mindestens zwei verschiedenen Modellen. Das erste Modell wird als Modell des "wechselnden Zugangs" (alternating access) bezeichnet (A). In diesem Modell binden stoichiometrische Mengen des Substrats (exzitatorische Aminosäure, EAA), von Na^+ und H^+ an der extrazellulären Seite. Der Transporter unterzieht sich dann einer Konformationsänderung, die dem Substrat und den Ionen den Zugriff auf das Cytoplasma ermöglicht. Danach bindet sich K^+ an den Transporter, der seine Konformation erneut ändert und nachfolgend K^+ in die extrazelluläre Umgebung entläßt. Eine Folgerung aus diesem Modell ist, daß keine zusätzliche Pore oder ein Kanal den Intra- und Extrazellulärraum verbindet. Ein zweites Modell wird als "Poren- oder Kanal-Modell" bezeichnet (B). Einige Subtypen der Transporter funktionieren auch als Ionenkanal, der für Cl^- durchlässig ist. Dieser Kanal befindet sich entweder direkt in der Hauptbahn des Substrats (B links) oder einem anderen Teil des Transporters und ist dort möglicherweise mit einem anderen Protein assoziiert (B rechts). Wenn der Cl^- -Kanal und die Substratbahn koexistieren, ist es möglich, daß mit jeder Öffnung des Transporters mehrere EAA-Moleküle transportiert werden (aus: Sims & Robinson, 1999).

1.4.1.3 Regionale und zelluläre Lokalisation der Transporter-Subtypen

Mit der Verfügbarkeit der cDNA-Sequenzen für jeden Transporter-Subtyp wurde es möglich, durch *in situ* Hybridisierung oder 'Northern blot'-Analysen die Verteilung der mRNA zu studieren. Die Protein-Exprimierung konnte durch Transporter-spezifische Antikörper lokalisiert werden. Durch diese Nachweisverfahren konnte die Transporterexprimierung während der Entwicklung untersucht werden (Übersichtsartikel: Robinson, 1999; Sims & Robinson, 1999). Eine Zusammenfassung der Studien ist in Tabelle 1 zu sehen.

Tabelle 1

Expressionsmuster der Transportersubtypen.

Transporter-Subtyp	Zelluläre Expression im Gehirn	Regionale Verteilung im ZNS
GLAST/EAAT1	Astrozyten / Bergmann-Glia im Cerebellum	Cerebellum > > Vorderhirn
GLT-1/EAAT2	Astrozyten (selten Neurone)	gleichmäßige Verteilung > > Vorderhirn > > Cerebellum
EAAC1/EAAT3	Neurone	Hippocampus > Cortex > Striatum, Mittelhirn, Cerebellum
EAAT4	Purkinje Zellen, evtl. Astrozyten	Cerebellum > > > restl. Gehirn
EAAT5	??	Retina > > > Gehirn

GLAST

Innerhalb des ZNS konnte die Expression von GLAST vorwiegend auf Astrozyten, speziell auf den Bergmann-Glia des Cerebellums, nachgewiesen werden und wurde anfänglich auch in Neuronen vermutet (Rothstein *et al.*, 1994). Die neuronale Expression konnte in Studien mit verschiedenen Antikörpern jedoch nicht bestätigt werden (Chaudhry *et al.*, 1995; Lehre *et al.*, 1995). In Übereinstimmung mit der cerebellaren Verteilung konnten in Mäusen mit ausgeschaltetem GLAST-Transporter Ataxien festgestellt werden (Watase *et al.*, 1998).

GLAST ist nicht gleichmäßig über die Plasmamembran der Astrozyten verteilt, d. h. in enger Nachbarschaft von Synapsen wurde mehr Protein gefunden als z. B. in der Nähe des Dendritenstammes (Chaudhry *et al.*, 1995). Dies läßt vermuten, daß interaktive Proteine GLAST in der Plasmamembran "anbinden" oder andere Eigenschaften, wie das Membranpotential, die Transporterverteilung kontrollieren. Dadurch steht der Transporter direkt nach der Freisetzung der EAAs zu deren Wiederaufnahme zur Verfügung.

GLT-1

Der GLT-1-Transporter ist beim Menschen vermutlich ausschließlich auf Astrozyten lokalisiert (Milton *et al.*, 1997), während seine mRNA bei Tieren teilweise auch in hippocampalen Neuronen gefunden wurde (Torp *et al.*, 1994). Ebenso wie GLAST ist auch GLT-1 an den Stellen der Plasmamembran verstärkt anzutreffen, die nahe bei den Synapsen liegen (Chaudhry *et al.*, 1995). Obwohl eine höhere Dichte von GLT-1 im Vorderhirn vermutet wurde (Lehre *et al.*, 1995) wird doch vorwiegend von einer gleichmäßigen Verteilung ausgegangen (Robinson, 1998).

Untersuchungen an GLT-1-defizienten Mäusen zeigten, daß diese Tiere eine erhöhte Anfälligkeit für kortikale Schädigungen und spontane epileptische Anfälle aufweisen (Tanaka *et al.*, 1997).

EAAC1

Es ist weithin anerkannt, daß sich die Expression von EAAC1 im Gehirn vor allem auf die Neurone beschränkt (Rothstein *et al.*, 1994). Neuere Untersuchungen zeigten inzwischen aber auch eine Lokalisation an Astrozyten (z.B. Conti *et al.*, 1998; Kanai & Hediger, 1992; Shashidharan *et al.*, 1997) und obwohl EAAC1 lange als Repräsentant eines präsynaptischen Transporters galt, offenbarte seine Immunoreaktivität doch eher eine Lokalisation in Dendriten und Zell-Somata (Coco *et al.*, 1997; Rothstein *et al.*, 1994). Diese Beobachtungen lassen eine vorherrschende Rolle für den Abtransport der freigesetzten EAAs fraglich erscheinen. Zudem wiesen EAAC1-defiziente Mäuse weder neurodegenerative Veränderungen auf, noch konnten spontane epileptische Anfälle beobachtet werden (Peghini *et al.*, 1997).

Die höchste Dichte der EAAC1-Expression wurde in Neuronen des Hippocampus und des Cortex beobachtet, gefolgt von niedrigerer Dichte im Mittelhirn, Striatum und Cerebellum (Rothstein *et al.*, 1994).

EAAT4

Im Originalartikel zur Klonierung des EAAT4-Transporters, ist mittels 'Northern blot' der mRNA eine Anreicherung im Cerebellum beschrieben worden (Fairman *et al.*, 1995). Mit Hilfe aktuell entwickelter Antikörper konnte eine starke Anreicherung in den postsynaptischen dendritischen Kontaktstellen und den distalen Dendriten der Purkinje-Zellen festgestellt werden. Eine sehr geringe Expression im Vergleich zum Cerebellum konnte auch im Vorderhirn registriert werden.

EAAT5

EAAT5 konnte erst in der letzten Zeit kloniert werden und die mRNA-Verteilung läßt auf eine vorrangig retinale Lokalisation schließen (Arriza *et al.*, 1997). Da für das Säugetier-Homolog dieses Transporters noch keine Antikörper entwickelt wurden, konnten entsprechende Studien nur an den Homologen des Salamanders durchgeführt werden (Eliasof *et al.*, 1998). In diesem System konnten zwei EAAT5-Homologe identifiziert werden, die beide verstärkt in den Müller-Zellen und der äußeren plexiformen Schicht angereichert sind.

1.4.2 Expression der Transporter in peripheren Geweben

Auch wenn das ZNS und die Retina im Mittelpunkt des Forschungsinteresses stehen, gibt es eine Anzahl von Veröffentlichungen, die bis in die 70-er Jahre zurückreichen und periphere Na⁺-abhängige Glutamattransporter beschreiben (Übersichtsartikel: Robinson & Dowd, 1997). Die Spezifität und Ionenabhängigkeit der Aktivität sind in den Grundzügen im ZNS und den peripheren Geweben gleich. Aus diesem Grund scheint es selbstverständlich, daß einige der klonierten Transporter auch in anderen Organen gefunden wurden. EAAC1 konnte in Leber, Niere und Dünndarm identifiziert werden (Übersichtsartikel: Robinson, 1999) und scheint auch in der Lunge und den Muskeln vorhanden zu sein (Hediger & Welbourne, 1999). Mäuse ohne EAAC1 zeigen eine verminderte Harnexkretion von Aspartat und Glutamat, was für eine Rolle dieses Transporters in der tubulären Wiederaufnahme von Glutamat und Aspartat aus dem glomerulären Filtrat spricht (Peghini *et al.*, 1997). Für GLAST gibt es inzwischen Hinweise auf Vorkommen im Herzen, der Lunge, den Skelettmuskeln, dem Knochenmark und der Plazenta (Übersichtsartikel: Robinson, 1999). Für GLT-1 ergaben neueste Untersuchungen, daß Vorkommen in der Plazenta, dem Knochenmark und der Leber nicht völlig auszuschließen sind (Hediger & Welbourne, 1999; Mason *et al.*, 1997).

Für EAAT4 konnte bis heute nur die mRNA in der Plazenta gefunden werden, während das Protein an sich nicht nachgewiesen wurde.

EAAT5 scheint in sehr geringem Maße in der Leber vorzukommen und Varianten der mRNA unterschiedlicher Größe werden im Herzen und den Muskeln vermutet.

Es ist sehr unwahrscheinlich, daß EAATs in all diesen Geweben der Regulation synaptischer Exzitation dienen. Vermutlich haben die identifizierten Transporter in diesem Fall auch die Aufgabe, Glutamat und Aspartat für Stoffwechselprozesse zu transportieren. Beeindruckend ist vor allem die Tatsache, daß zumindest einige Transporter (GLT-1, EAAT4,

EAAT5) relativ spezifisch für das Gehirn oder die Retina sind. Dies könnte auf eine einheitliche Rolle dieser Transporter hinweisen, z.B. Erhaltung eines hohen Signal-Rausch-Verhältnisses, Einschränkung der Exzitotoxizität und eine Funktion als Liganden-gesteuerte Ionenkanäle.

1.4.3 Entwicklungsbedingte Expression der Transporter-Subtypen

Die ontogenetische Exprimierung der verschiedenen Transporter war Gegenstand vieler neuerer Studien (Übersichtsartikel: Robinson, 1999; Sims & Robinson, 1999). Es ist interessant zu sehen, daß die Expression von EAAC1 ihren Höhepunkt schon am 5. postnatalen Tag erreicht, sich für die übrigen Transporter aber stufenweise während der Entwicklung erhöht. So steigen die Dichten für GLT-1 und EAAT4 dramatisch in der Zeit an, die mit der Synaptogenese und der Entwicklung funktioneller Astrozyten verbunden ist (Furuta *et al.*, 1997). Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß in der frühen Entwicklung andere Prozesse für die Beseitigung extrazellulärer EAAs verantwortlich sind als in späteren Stadien. Dies könnte der Grund für die hohe Sensitivität des ZNS in der frühen Entwicklung gegenüber Exzitotoxinen sein (Übersichtsartikel: McDonald & Johnston, 1990).

Basierend auf der unterschiedlichen Verteilung der Glutamattransporter im ZNS wurden verschiedene elektrophysiologische Untersuchungen zum Einfluß der pharmakologischen Blockade der Glutamataufnahme auf die verschiedenen glutamatergen Ströme vorgenommen. So konnte in Purkinje- und anderen Zellen des Kleinhirns nach der Blockade der Glutamattransporter eine Verlängerung der EPSCs gezeigt werden (Barbour *et al.*, 1994; Kinney *et al.*, 1997; Otis *et al.*, 1996; Overstreet *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 1995). Dasselbe gilt für AMPA-EPSCs an kultivierten hippocampalen Neuronen (Mennerick *et al.*, 1999; Mennerick & Zorumski, 1995). Diese kinetischen Effekte beruhen vermutlich darauf, daß die Glutamattransporter den "Spillover" (das Überlaufen) von Glutamat zu angrenzenden Synapsen vermindern (Rusakov & Kullmann, 1998) und konnte unter anderem auch an Synapsen der CA1-Region des Hippocampus gezeigt werden, wo vor allem gliale Transporter das Ausmaß des 'Spillover' limitieren (Kullmann & Asztely, 1998). Zusätzlich wurde an den Moosfaser-Synapsen der CA3-Region eine Aktivierung präsynaptischer mGluRs nach Inhibition der Glutamattransporter nachgewiesen (Min *et al.*, 1998; Scanziani *et al.*, 1997; Vogt & Nicoll, 1999). Ebenfalls an kultivierten hippocampalen Neuronen haben Tong und Jahr (1994) gezeigt, daß die lokal exprimierten Transport-Moleküle auch von Bedeutung für die Amplitude

von AMPA-EPSCs sein können, da sie durch Bindung des Transmitters bei physiologischer Temperatur eine Pufferwirkung auf die lokale Glutamatkonzentration entfalten (Tong & Jahr, 1994). Dagegen stehen zahlreiche Beobachtungen, in denen die pharmakologische Blockade der Glutamatttransporter keinen kinetischen Effekt hatte (Hestrin *et al.*, 1990; Isaacson & Nicoll, 1993; Maki *et al.*, 1994; Sarantis *et al.*, 1993). Die Amplitude der non-NMDA-EPSCs blieb in einigen dieser Studien weitgehend unverändert, während sich bei den NMDA-EPSCs signifikante Amplitudenveränderungen zeigten (Hestrin *et al.*, 1990; Sarantis *et al.*, 1993).

Im Gegensatz zu den zahlreichen morphologischen und elektrophysiologischen Untersuchungen der Glutamatttransporter in der Retina, dem Cerebellum und dem Hippocampus, ist deren funktionelle Bedeutung im entorhinalen Cortex kaum bekannt. Aus diesem Grund werden im Folgenden seine Anatomie und funktionelle Stellung im limbischen System sowie seine Beteiligung an Krankheiten des ZNS, die häufig mit Störungen des glutamatergen Systems einhergehen, beschrieben.

1.5 Anatomie des entorhinalen Cortex

Die Regio entorhinalis liegt in der parahippocampalen Region im unteren Pol des Temporallappens. Sie wird lateral von der Area perirhinalis des temporalen Isokortex durch den Sulcus rhinalis und caudal von der Regio praesubicularis begrenzt. Der entorhinale Cortex (EC) nimmt eine wichtige Stellung im limbischen System ein und ist darüber hinaus eine Verbindungsstelle zwischen Hippocampus und Cortex (Abb. 4). Unter anatomischen und funktionellen Gesichtspunkten wird der EC in eine mediale (mEC) und laterale (IEC) Region unterteilt.

Der entorhinale Cortex besteht aus sechs Schichten, die aufgrund ihrer inneren Struktur und extrinsischer Verschaltungen in eine obere (äußere) und eine tiefere (innere) Hauptschicht unterteilt und durch die Lamina dissecans getrennt werden (Witter *et al.*, 1989). Dabei gehören die Schichten I bis III zur oberen, die Schichten IV bis VI zur tiefen Hauptschicht des EC.

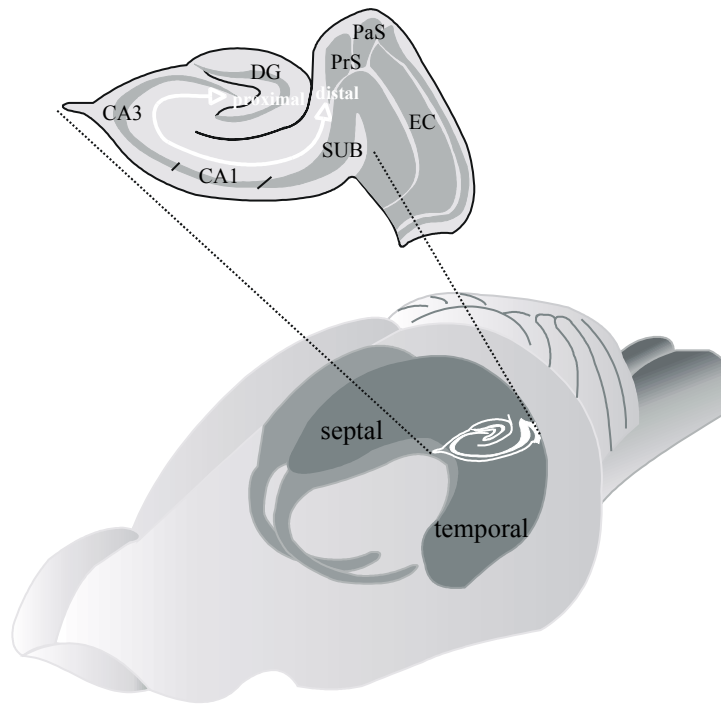


Abbildung 4

Dreidimensionale Ansicht des Rattenhirns von der lateralen, frontalen Seite, mit eingezeichnetem, C-förmigen Hippocampus. Die septo-temporale Orientierung des Hippocampus ist angezeigt. Der Ausschnitt zeigt die Unterteilungen des Hippocampus und die Orientierung der transversen Achse von proximal (nahe DG) nach distal (nahe EC). Abkürzungen: CA, Cornu ammonis; DG, Gyrus dentatus; EC, entorhinaler Cortex; PaS, Parasubiculum; PrS, Präsubiculum; SUB, Subiculum (aus: Witter *et al.*, 2000).

1.5.1 Extrinsischer Schaltkreis zwischen entorhinalem Cortex und Hippocampus

Ramón y Cajal schrieb schon 1901, daß der Schlüssel zum Verständnis des Hippocampus im entorhinalen Cortex liege. Seine Hypothese beruhte auf der Entdeckung einer mächtigen Projektion vom entorhinalen Cortex zur Area dentata, dem sogenannten Tractus perforans. Die Projektion entspringt den Prinzipalzellen der Schicht II des entorhinalen Cortex und führt über das anguläre Band, das Subiculum und die hippocampale Fissur in die Molekularschicht der Fascia dentata (Ruth *et al.*, 1982; 1988; Schwartz & Coleman, 1981). Mit diesem Tractus beginnt eine wichtige trisynaptische Kette, die mit der ersten Synapse an den Dendritenbäumen der Körnerzellen startet (Ruth *et al.*, 1982; 1988; Schwartz & Coleman, 1981; Storm-Mathisen & Ottersen, 1984). Von hier aus ziehen die Axone der Körnerzellen, die Moosfasern, in Richtung Area CA3 und führen damit zum zweiten synaptischen Kontakt. Die Pyramidenzellen der CA3-Region projizieren als Schaffer-Kollaterale in die Area CA1 (Amaral & Witter, 1989; Andersen *et al.*, 1971) und vollenden damit die trisynaptische Kette. Die CA1-Region projiziert nun wieder Richtung Subiculum und Schicht IV bis VI des entorhinalen Cortex (Swanson & Cowan, 1977). Außerdem wurden massive Projektionen von den tiefen

zu den oberen Schichten des EC gezeigt (Dolorfo & Amaral, 1998; Köhler, 1986). Mit diesen letzten Synapsen schließt sich dann die EC-hippocampale "Schleife" (Abb. 5).

Die Projektion der Schicht-II-Zellen des entorhinalen Cortex zur Area dentata stellt zwar den stärksten Eingang zum Hippocampus dar, wird aber noch von einer zweiten Bahn komplettiert. Diese entspringt den Projektionsneuronen der Schicht III und führt direkt, ohne den "Umweg" über die Area dentata zu nehmen, hauptsächlich in das Subiculum und das Stratum moleculare der CA1-Region (Witter, 1993). Inzwischen wurden auch Verbindungen von den tiefen Schichten IV-VI zur Area dentata (Gloveli *et al.*, 2000), dem Subiculum (Deller *et al.*, 1996) und direkte Projektionen von der Schicht II zur CA3-Region gefunden.

Die Hauptausgangsstruktur des Hippocampus stellt das Subiculum dar. Von hier aus projiziert der Hippocampus einerseits über die Fornix in subcorticale Regionen wie die lateralen und basolateralen Kerne der Amygdala (Chrobak *et al.*, 2000), Thalamus (Shibata, 1996), Hypothalamus, Hirnstamm, Septum (Swanson & Cowan, 1977) und das Striatum (Sorensen, 1985; Thierry *et al.*, 2000) sowie andererseits über parahippocampale Regionen in "höhere" Cortices. Inzwischen wurden auch direkte Projektionen vom EC zu den Kernen der Amygdala gefunden (von Bohlen u. Halbach, O. *et al.*, in Vorbereitung). Viele dieser Verbindungen sind unmittelbar reziprok (Burwell, 2000; Witter *et al.*, 2000).

Das Zentrum der parahippocampalen Region, der entorhinale und perirhinale Cortex, ist somit eng mit der Hippocampusformation und den subcorticalen Gebieten verbunden. Der entorhinale und perirhinale Cortex ihrerseits erhalten Informationen aus verschiedenen Gebieten wie den visuellen, polymodalen, olfaktorischen, parietalen, somatosensorischen und auditorischen Systemen. Auch hier sind viele dieser Verbindungen reziprok (Suzuki & Eichenbaum, 2000). Die Hauptausgangsstruktur für die parahippocampale Formation stellen dabei in den meisten Fällen die Zellen der tiefen Schicht des EC dar, die unter anderem in die Kerne der Amygdala (von Bohlen u. Halbach, O. *et al.*, in Vorbereitung), das Striatum (Sorensen, 1985) und den Thalamus (Shibata, 1996) projizieren.

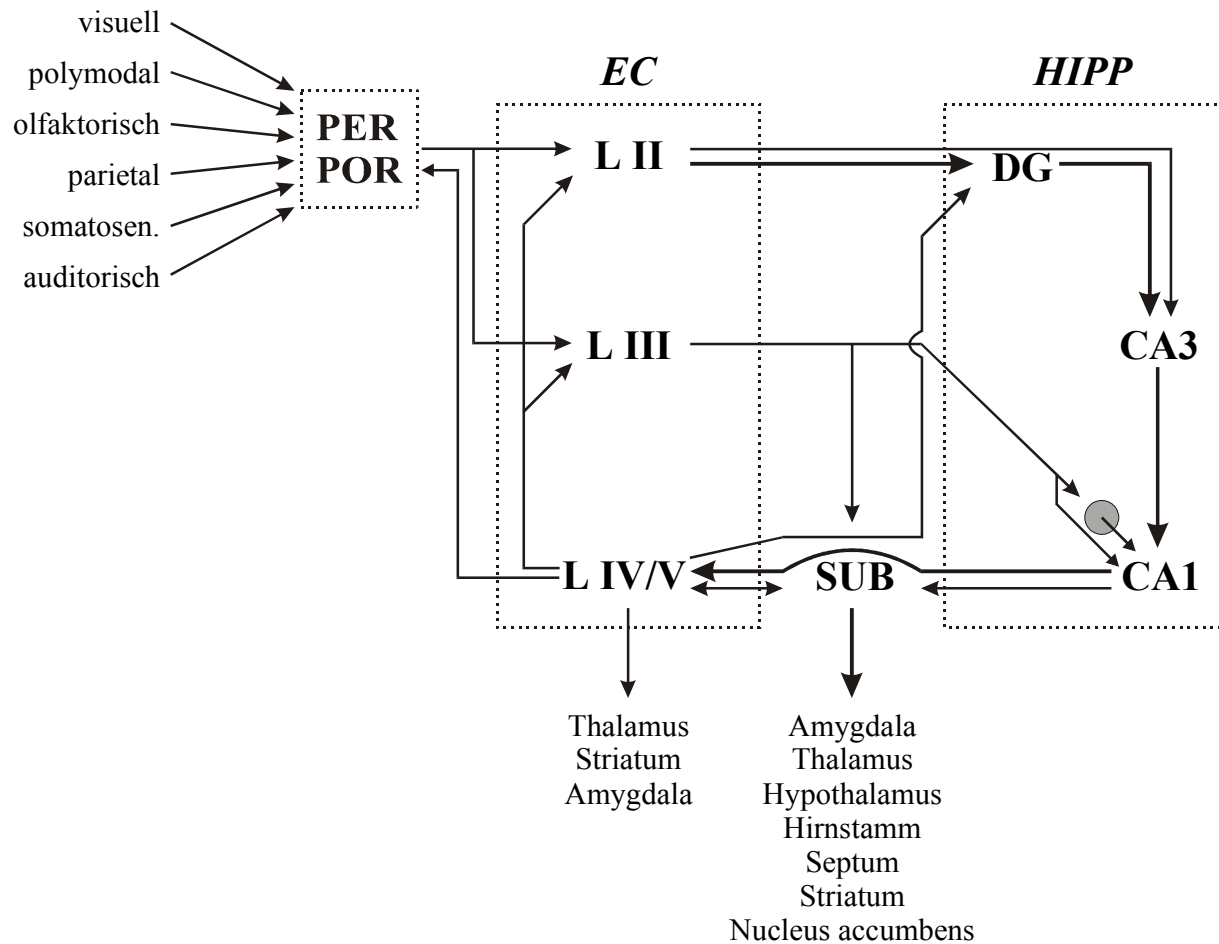


Abbildung 5

Schematische Darstellung der Verschaltung zwischen entorhinalem Cortex (EC) und Hippocampus (HIPP). Dargestellt sind die oberflächlichen Schichten II und III (L II, L III) und tiefen Schichten (L IV/V) des EC sowie Regionen des Hippocampus. Die Eingänge des EC kommen aus dem perirhinalen (PER) und postrhinalen (POR) Cortex.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Für den entorhinalen Cortex und den Neurotransmitter Glutamat lassen sich viele gemeinsame Anknüpfungspunkte finden. So sind z.B. beide in Lern- und Gedächtnisprozesse involviert. Der entorhinale Cortex ist dabei weit davon entfernt, nur als "Verbindungsschacht" für die obengenannten Ein- und Ausgänge zu fungieren. Er verfügt über komplexe Netzwerkeigenschaften, die bei Signalprozessen eine wichtige Rolle spielen (Gloveli *et al.*, 1997a; Insausti *et al.*, 1993; Jones, 1993) und seine Projektion zum Hippocampus ist in die Induktion von Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus involviert (Staubli & Lynch, 1987). Bezüglich des Glutamatsystems wird vor allem den NMDA-Rezeptoren und den mGluRs eine wichtige Rolle in der Plastizität der synaptischen Transmission, wie z.B. bei LTP und Langzeitdepression (LTD) zugesprochen (Collingridge & Singer, 1990; Manahan-Vaughan, 1997).

Ein gestörtes glutamaterges System ist die Ursache für verschiedene Krankheiten des ZNS und somit von klinischem Interesse. Übersteigt extrazelluläres Glutamat einen eng definierten Konzentrationsbereich, kommt es zur exzitotoxischen Schädigung vieler Neurone (Übersichtsartikel: Sims & Robinson, 1999). Erhöhte Glutamatkonzentrationen werden dabei mit langsam fortschreitenden neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer-Demenz, amyotropher Lateralsklerose (ALS) und Parkinson (Ludolph *et al.*, 1998; Plaitakis & Shashidharan, 2000; Rothstein *et al.*, 1992) in Verbindung gebracht, während zu niedrige Konzentrationen mit psychotischen Zuständen und Schizophrenie (Olney *et al.*, 1999) in Zusammenhang stehen könnten. Viele dieser neurologischen und psychiatrischen Krankheiten gehen mit Störungen des entorhinalen Cortex einher. So sind für Alzheimer-Patienten Gedächtnisstörungen zu Beginn der Erkrankung charakteristisch (Flicker *et al.*, 1991), die vermutlich auf pathologischen Veränderungen des EC beruhen (Braak & Braak, 1991). Im Phencyclidin-Modell der Schizophrenie führt Blockade des NMDA-Rezeptor Kanals zu selektiven funktionellen und strukturellen Veränderungen der Schicht-III-Neurone des EC (Castrén *et al.*, 1993; Gloveli *et al.*, 1997b; Lindén *et al.*, 1997). Die Interaktion zwischen verschiedenen Transmittersystemen, wie z.B. GABA, Azetylcholin, Dopamin und Glutamat ist verantwortlich für die Dysfunktion und die nachfolgenden Verluste von Neuronen in diesem Modell (Benes, 1999; 2000; Benes & Berretta, 2000; Farber *et al.*, 1993; Olney *et al.*, 1991; Olney & Farber, 1995).

Störungen im glutamatergen System spielen auch bei Epilepsien eine Rolle (Meldrum *et al.*, 1999; Tanaka *et al.*, 1997). So konnte gezeigt werden, daß die Initiation der epileptischen Spontanentladungen von AMPA-Rezeptoren abhängig ist, während die NMDA-Rezeptoren zu den späteren Komponenten dieser krampfartigen Depolarisationen beitragen. Dabei sind die NMDA-Rezeptoren für den Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich, der mit diesen anfallsartigen Entladungen einhergeht (Meldrum *et al.*, 1999). Der entorhinale Cortex ist eine Schlüsselstruktur in der Generierung der Temporallappenepilepsie (Du *et al.*, 1995; Jones & Heinemann, 1988). Eine der Ursachen scheint die reziproke synaptische, meistens NMDA-Rezeptor vermittelte Verbindung zwischen tiefen und oberflächlichen Schichten des EC zu sein, welche zu massiven Erregungen führt (Jones & Heinemann, 1988; Schmitz *et al.*, 1997).

Zusätzlich wurden noch pathologische Veränderungen des entorhinalen Cortex bei Krankheiten wie Argyrophilic grain disease (AGD), Morbus Pick, Parkinson und Chorea Huntington (Braak *et al.*, 2000; Braak & Braak, 2000) festgestellt.

Voraussetzung für die Funktion von Glutamat als Neurotransmitter ist ein effektiv arbeitendes Kontrollsystem (Gegelashvili & Schousboe, 1997; 1998; Tanaka, 2000). Als Beitrag

zur weiteren Aufklärung der funktionellen Rolle der Glutamattransporter im EC wurden in dieser Arbeit die Folgen pharmakologischer Modulation dieser Transporter untersucht. Ausgelöst wurden diese Modulationen durch Applikation von Inhibitoren der Glutamattransporter. Das Hauptaugenmerk lag vor allem auf Veränderungen der exzitatorischen synaptischen Übertragung in den Schichten III und V des mEC nach der Inhibition der Glutamattransporter. Die Untersuchungen wurden an Hirnschnitten der Ratte, von Wildtyp-Mäusen und genetisch modifizierten Mäusen (EAAC1-knock-out) durchgeführt. Es sollte geklärt werden, ob die beobachteten Effekte über prä- oder postsynaptische Mechanismen vermittelt werden und in welchem Ausmaß ionotrope und/oder metabotrope Glutamatrezeptoren beteiligt sind. Konkret wurden folgende Fragen untersucht:

- Lassen sich schichtspezifische Unterschiede im mEC in der Wirkung auf die einzelnen Komponenten der Feldpotentiale bei Gabe der Glutamattransporter-Inhibitoren feststellen?
- Gibt es Änderungen in den Amplituden der Feldpotentiale in Abhängigkeit von der Konzentration der Glutamattransporter-Inhibitoren?
- Sind die Änderungen der Feldpotentiale abhängig von dem benutzten Glutamattransport-Inhibitor?
- Gibt es Unterschiede in Abhängigkeit von der benutzten Tierart (Ratte, Wildtyp-Maus, EAAC1-knock-out-Maus)?
- Bewirkt die Inhibition der Glutamattransporter Änderungen in den intrinsischen Zelleigenschaften?
- Hat die Inhibition der Glutamattransporter unterschiedliche Auswirkungen auf die pharmakologisch isolierten Ströme postsynaptischer Zellen?
- Läßt sich ein prä- oder postsynaptischer Wirkmechanismus identifizieren?
- Über welche Rezeptoren werden mögliche Veränderungen bei Inhibition der Glutamattransporter vermittelt?

2 Material & Methodik

2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden vorwiegend an adulten weiblichen oder männlichen Wistar-Ratten (180 – 250 g) durchgeführt. Für die Patch-Clamp-Ableitungen wurden Wistar-Ratten im Alter von 5-6 Wochen verwendet. Weiterhin wurden für diese Arbeit Untersuchungen an Wildtyp-Mäusen (CD1-Mäuse; Charles River, Sulzfeld, Deutschland) und EAAC1-knockout-Mäusen (EAAC1-Mäuse; MEMOREC Stoffel GmbH, Köln, Deutschland) durchgeführt. Alle Versuchstiere wurden in der Tierversuchshaltung unter standardisierten Bedingungen mit Wasser und Trockenfutter ad libitum gehalten. Der Tagesrhythmus von 12:12 Stunden war nicht invertiert. Es lag eine Tötungsgenehmigung für die Tiere vor und es wurde gemäß nationaler und internationaler Richtlinien angestrebt, den Streß der Tiere vor bzw. während der Präparation so gering wie möglich zu halten und nur die unbedingt erforderliche Menge an Tieren zu töten.

2.2 Hirnschnittpräparation

Alle dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimente erfolgten an horizontalen Hirnschnittpräparaten aus den Temporallappen der Versuchstiere (Abb. 6D). Für die Organentnahme wurden die Tiere mit Äther in tiefe Narkose versetzt und daraufhin dekapitiert. Das Kopffell wurde von der Nase bis zum Nacken mit einem Skalpell gespalten, um das Schädeldach freizulegen. Anschließend wurde die bei Nagetieren sehr ausgeprägte Massetermuskulatur mit Hilfe eines Skalpells und eines Knochenschabers entfernt. Es folgten Einschnitte an den lateralen Rändern des Foramen magnum mit einer scharfen Knochenzange, die es ermöglichten, die Schädelkalotte nach frontal wegzuklappen. Nach Entfernung der Dura mater wurde dann hinter dem ersten frontalen Hirndrittel ein durchtrennender Schnitt mit dem Skalpell gesetzt. Nachfolgend konnten dann das mittlere und hintere Drittel gemeinsam mit dem Cerebellum dem Schädel entnommen werden (Abb. 6A). Nach der Trennung der zwei Hemisphären wurden das Cerebellum und das mittlere Drittel des Gehirns entfernt (Abb. 6B). Das caudale Drittel wurde in einer tiefgekühlten Kammer mit Sekundenkleber fixiert und unmittelbar darauf mit eisgekühlter artifizieller cerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF) umspült. Mit Hilfe eines Viboslicers (Campden Instruments Ltd.) wurde das Gehirn von der basalen Fläche beginnend

geschnitten (Abb. 6C). Die kombinierten Schnitte mit einer Dicke von 400 μm wurden unter Zuhilfenahme eines Pinsels und eines Spatels in die Meßkammer überführt.

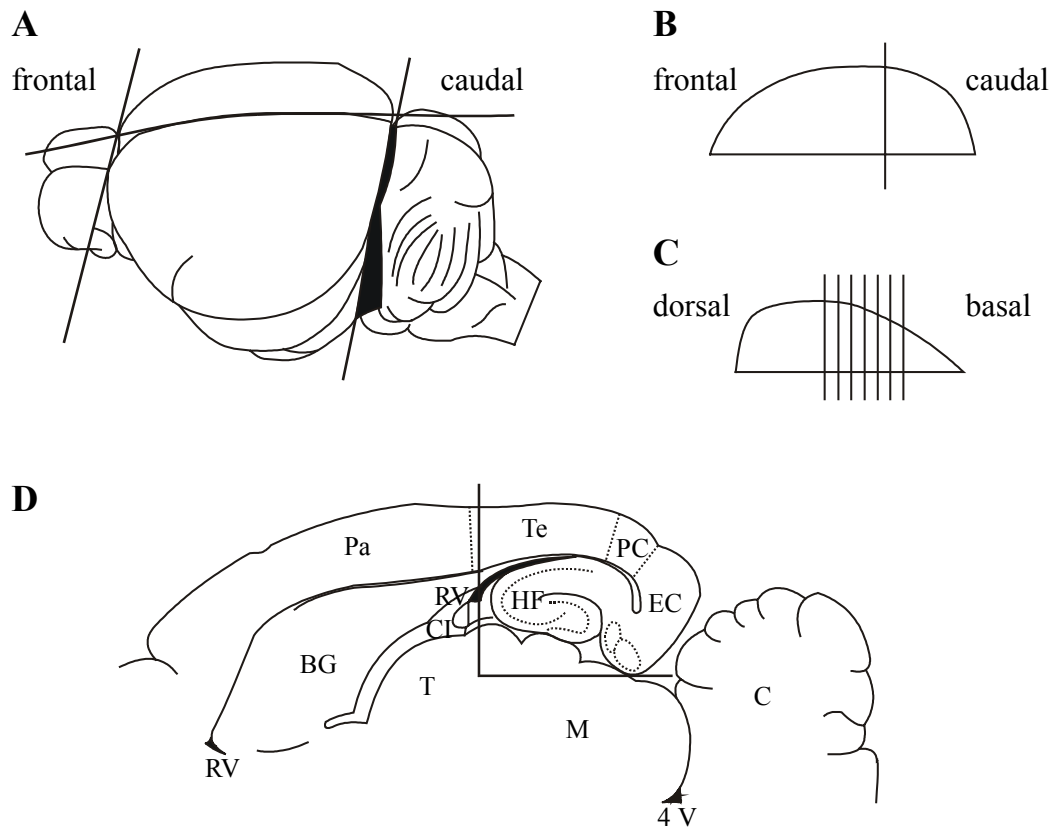


Abbildung 6

Präparation von horizontalen temporalen Hirnschnitten des Cortex. (A) Die durchgezogenen Linien markieren die Stellen, an denen die ersten Schnitte gesetzt wurden. Nach Entfernung des Cerebellums wurde das Cerebrum in zwei Hemisphären geteilt. (B) Laterale Ansicht auf eine der beiden Hemisphären. Die Linie zeigt an, daß die zwei frontalen Drittel verworfen wurden. (C) Das verbliebene caudale Drittel wurde dann mit einem Vibroslicer (Campden Instruments Ltd.) geschnitten. Die Linien zeigen die Schnittrichtung an. (D) Anatomische Relation eines horizontalen temporalen Cortex-Schnittes zu benachbarten Strukturen. Abkürzungen: 4V, vierter Ventrikel; BG, Basalganglien; C, Cerebellum; CI, Capsula interna; EC, entorhinaler Cortex; HF, hippocampale Formation; M, Mesenzephalon; Pa, parietaler Cortex; PC, perirhinaler Cortex; RV, rechter Ventrikel; T, Thalamus; Te, temporaler Cortex (nach Paxinos & Watson, 1986).

2.3 Meßkammer

Die in diesen Experimenten benutzte Meßkammer besteht aus Plexiglas und ist durch angeschraubte Magnete (Kammerunterseite) stabil mit der vibrationsgeschützten Arbeitsfläche verbunden. Die Perfusionskammern sind zwei rechteckige Einlassungen, die durch seitliche Öffnungen mit dem darunterliegenden Hohlraum des Gehäuses in Verbindung stehen. Durch ihre oberflächliche Lage waren sie leicht für die Ableitelektroden zugänglich. Der Hohlraum unter den Meßkammern war einige Zentimeter hoch mit destilliertem Wasser gefüllt, das über eine Heizspirale erwärmt wurde. Zusätzlich wurde das Wasser mit Carbogen durchsprudelt,

so daß das Carbogen auf ca. 36 °C erwärmt und mit Wasserdampf gesättigt war. Die über dem Wasser gelegenen 2/3 des Hohlraumes bildeten die wasserdampf- und carbogengesättigte Atmosphäre, die über die seitlichen Öffnungen die Hirnschnitte versorgte. In diese Atmosphäre war ein Thermosensor eingebaut, über den die Atmosphärentemperatur um den Wert 34.5 °C konstant gehalten wurde. Gleichzeitig wurden die Meßkammern mittels einer Rollenschlauch-Pumpe (Fa. Abimed) über Polyethylenschläuche kontinuierlich mit 1.5 – 1.8 ml/min carbogengesättigter ACSF perfundiert. Diese ACSF wurde in einem Wasserbad auf 36 °C vorgewärmt und dann in dem Hohlraum unter den Meßkammern nacherwärmt, um eine konstante Temperatur zu gewährleisten. Die Perfusionslösung floß passiv aus den Kammern ab. Unter diesen Bedingungen konnten die Hirnschnitte etwa 12 - 16 Stunden vital erhalten werden.

In jeder der beiden voneinander isolierten Perfusionskammern wurden mehrere kombinierte Schnitte aufbewahrt. Sie wurden auf doppellagigem Spezialpapier (Kodak, lens cleaning paper) eine Stunde lang ruhen gelassen, bevor das Experiment begann.

2.4 Meßanordnung

Mit einem chlorierten Silberdraht, der in den jeweiligen Ableitelektroden steckte, konnten spontan auftretende oder reizinduzierte Potentiale bzw. Ströme über einen Vorverstärkerkopf ("Headstage") bzw. Impedanzwandler den entsprechenden Verstärkern zugeführt werden. Bei der Messung der Feldpotentiale wurde dazu ein Differenzverstärker mit Kapazitätsneutralisation benutzt. Der diskontinuierliche Verstärker SEC10L (NPI Instruments, Deutschland) wurde für intrazelluläre Ableitungen verwendet, während Patch-Clamp-Ableitungen mit dem EPC-7 (HEKA, Deutschland) erfolgten. Die aus den Verstärkern kommenden Signale wurden mit Hilfe von Zwischenverstärkern gegebenenfalls nachverstärkt und gefiltert. Von hier wurden die Signale direkt auf einem Speicheroszilloskop dargestellt und über einen Analog/Digital-Wandler (ITC-16, Instrutech Corp., USA) mit einem Computer unter Verwendung der Programme Wintida 3.0 (Heka, Deutschland), ISO2 (MFK, Niedernhausen, Deutschland) oder Videoband zur späteren Auswertung erfaßt. Die elektrische Reizung des Gewebes erfolgte über die digitalen und analogen Ausgänge eines Interfaces (ITC-16) und einer Reizisoliereinheit. Es wurde bipolar mit einer Reizdauer von 50 bzw. 100 µs gereizt.

2.4.1 Reizelektroden

Die Stimulierung des medialen entorhinalen Cortex (mEC) erfolgte in der mittleren Schicht des lateralen entorhinalen Cortex (IEC) über isolierte bipolare Reizelektroden (Abb. 7). Zur Herstellung der Reizelektroden wurden Silberdrähte an einem Ende mit Platin-Iridium-Drähten (\varnothing 50 μ m) verlötet und mit dieser Seite voran in je einen Schenkel einer doppellumigen Thetaglaskapillare geschoben, bis ca. 500 μ m des Drahtes aus der Kapillarspitze ragten. Unter einem Mikroskop wurden diese beiden Enden mittels erhitzten Schellacks so gegeneinander isoliert, daß die Drähte parallel ausgerichtet waren und ihr Abstand ca. 50 - 100 μ m betrug.

2.4.2 Referenzelektroden

Zur Herstellung der Referenzelektrode wurde aus einem pulverförmigen Gemisch, bestehend aus Silber und Silberchlorid im Verhältnis 1:3, ein Preßling erarbeitet. Ein in den Preßling eingearbeiteter chlorierter Silberdraht wurde mit einem Anschlußstecker und über seine gesamte Länge mit einem Schrumpfschlauch zum Schutz vor Oxydation versehen.

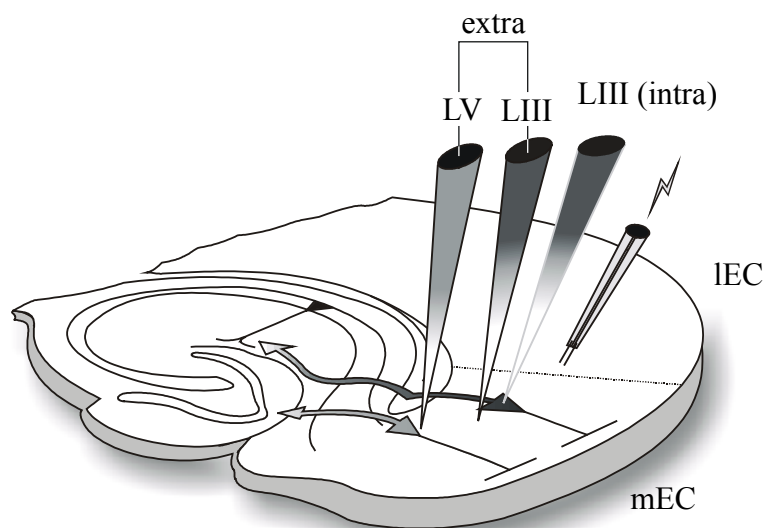


Abbildung 7

Schematische Darstellung der Ableitorte und des Reizortes für die extra- und intrazellulären Ableitungen. Die Reizelektrode wurde in den mittleren Schichten des lateralen entorhinalen Cortex (IEC) plaziert. Zusätzlich sind auch die Projektionen der Zellen der Schichten III (LIII) und V (LV) vom medialen entorhinalen Cortex (mEC) in die hippocampale Formation gezeigt.

2.5 Lösungen und Pharmaka

2.5.1 Perfusionslösung

Als Nährmedium sowohl während der Präparation als auch in der Equilibrierungs- und Experimentierphase wurde eine artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) folgender Zusammensetzung (in mM) verwendet: NaCl 129, KCl 3, CaCl₂ 1.6, MgCl₂ 1.8, NaHCO₃ 21, NaH₂PO₄ 1.25, Glucose 10. Die Lösung wurde im Experiment auf ca. 36°C erwärmt und der pH-Wert betrug unter Begasung mit Carbogen 7.4 ± 0.5 .

2.5.2 Pharmaka

Die meisten während dieser Arbeit applizierten Substanzen sind -wenn möglich- in Stammlösungen angesetzt worden. Im Experiment wurden die Pharmaka auf die erwünschten Konzentrationen im entsprechenden Nährmedium verdünnt und der pH-Wert auf 7.4 eingestellt. Wenn die Labilität einiger Substanzen es erforderte, wurden sie vor dem Experiment frisch angesetzt. In den meisten Fällen wurden die Pharmaka mit der Badlösung appliziert. Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die zur Anwendung gekommenen Verbindungen.

Tabelle 2
Pharmakologische Substanzen.

	<u>Konzentration</u>	<u>Wirkung</u>
APV	60 µM	NMDA-Antagonist
Bicuculline methiodide	5 µM	GABA _A -Antagonist
CGP 55845A	1 µM	GABA _B -Antagonist
CNQX	30 µM	AMPA/Kainat-Antagonist
DHK	200 – 400 µM	Glutamat-Transport-Inhibitor
EGLU	200 µM	Gruppe II mGluR-Antagonist
L- <i>trans</i> -2,4-PDC	200 – 400 µM	Glutamat-Transport-Inhibitor (kompetitiv)
LY 300164	100 µM	AMPA-Antagonist
MCPG	500 µM	mGluR-Antagonist (Gruppe I&II)
NBQX	10 µM	AMPA/Kainat-Antagonist
DL-TBOA	150 µM	Glutamat-Transport-Inhibitor
<i>trans</i> -(±)-ACPD	100 µM	mGluR-Agonist (Gruppe I&II)
TTX	1 µM	Blockade des schnellen Na ⁺ -Stromes

2.6 Elektrophysiologische Untersuchungen

Die Untersuchungen für diese Arbeit wurden an kombinierten Schnitten der Hippocampusformation durchgeführt. Die Schnitte enthielten außer dem Hippocampus das Prä- und Parasubiculum, den entorhinalen und perirhinalen Cortex, den temporalen Cortex Area 3 und im weiter dorsalen Bereich auch Anteile des temporalen Cortex Area 2 und 1. Durch elektrische Stimulation der oberflächlichen Schichten (Schicht II-III) des IEC ließen sich die im Folgenden beschriebenen evozierten Potentiale hervorrufen. In diese Arbeit gingen extrazelluläre Messungen der Feldpotentiale der Schichten III und V des mEC von Wistar-Ratten und Mäusen (CD1- und EAAC1-Mäuse), intrazelluläre sowie Patch-clamp-Ableitungen von Zellen der Schicht III des mEC der Ratte ein. Für alle Messungen wurde nach dem Einwaschen der Substanzen ein neuer Hirnschnitt genommen.

2.6.1 Extrazelluläre Messungen

2.6.1.1 Experimentelles Protokoll

Mit Hilfe einfacher monokapillarer Feldpotentialelektroden ist man in der Lage, sowohl schnelle als auch langsame Veränderungen der Feldpotentiale zu registrieren. Auf diese Weise können durch elektrische Reize ausgelöste transiente Feldpotentialänderungen erfaßt werden. Nach Auslösung erster Feldpotentiale wurden die Hirnschnitte weitere 30 min unter ständiger Reizung inkubiert, um die Ableitung stabiler Feldpotentiale zu gewährleisten. Für die Aufzeichnungen wurden Intensitäten von 30 %, 70 % und 100 % der Stimulationsintensität, die zur Auslösung eines maximalen Signals vonnöten gewesen wäre, benutzt. Nach Erhalt stabiler Antworten wurde sowohl für die Schicht III als auch für die Schicht V folgendes Protokoll zur Badapplikation der Pharmaka benutzt:

Tabelle 3

Experimentelles Protokoll für die extrazellulären Messungen.

<u>Substanz</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Einwaschzeit</u>	<u>Tier</u>
DHK	200 µM	60 min	Ratte
DHK	400 µM	15 min	Ratte
L-trans-2,4-PDC	200 µM	60 min	Ratte
L-trans-2,4-PDC	400 µM	15 min	Ratte; CD1-Maus; EAAC1-Maus
DL-TBOA	150 µM	20 min	CD1- & EAAC1-Maus

2.6.1.2 Feldpotential-Elektroden

Bei den Elektroden für die extrazellulären Messungen handelt es sich um Glaskapillaren (Borosilikatglas), die mit einem Elektrodenziehgerät (vertikaler Chicago-Puller, Eigenbau) ausgezogen und unter mikroskopischer Sicht auf einen Spitzendurchmesser von 2-3 μm zurückgebrochen wurden. Zur Messung der Feldpotentiale wurde die Elektrode anschließend mit 154 mM NaCl gefüllt und ein chlorierter Silberdraht zur Verbindung mit dem Verstärkereingang eingetaucht. Die Ableitung erfolgte extrazellulär in der oberflächlichen Schicht III (LIII) und der tiefen Schicht V (LV) des medialen entorhinalen Cortex. Die registrierten Potentiale sind Summenpotentiale.

2.6.1.3 Analyse der Feldpotentiale

Die Feldpotentiale der Schichten III und V weisen zahlreiche Gemeinsamkeiten auf. Sie besitzen in beiden Schichten eine schnelle und langsame negative Komponente, zwischen denen eine positive Komponente liegt. Ausgewertet wurden in jedem Fall die jeweiligen Maxima der Amplituden und die Zeit, die nach dem Stimulus zum Erreichen dieser Maxima vonnöten war (Abb. 8).

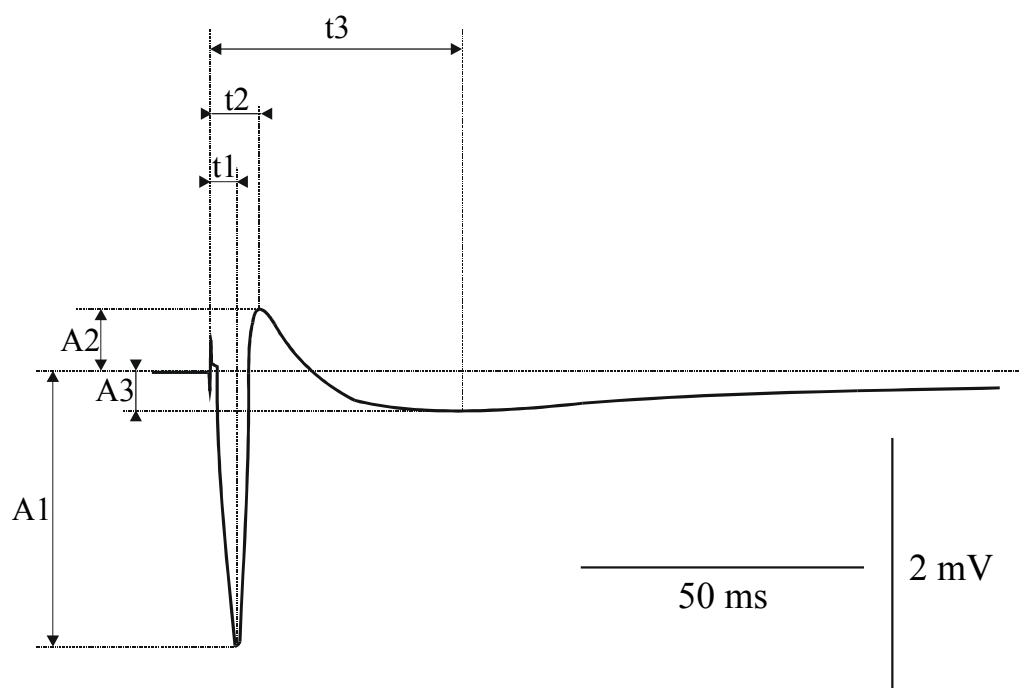


Abbildung 8

Darstellung eines Feldpotentials mit eingezeichneten Analyseorten. A1 und t1 bezeichnen die Amplitude (A1) der ersten negativen Komponente und der Zeit (t1) bis zum Erreichen des Amplitudenmaximums. A2 und t2 sagen dasselbe für die positive und A3 und t3 für die zweite negative Komponente des Feldpotentials aus. Dieses Analyseschema wurde für Feldpotentiale beider Schichten (III und V) benutzt.

Die Messungen wurden "offline" unter Verwendung der Software Wintida 3.0 (Heka, Lambrecht, Deutschland) ausgewertet. Die Daten entsprechen Mittelwerten von 6-10 Durchläufen pro Aufnahme und sind als Mittelwert \pm S.E.M. (Standardfehler des Mittelwertes) dargestellt. Eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ wurde als signifikant angesehen (Student's *t* Test; SPSS Inc., USA).

2.6.2 Intrazelluläre Messungen

Mit Hilfe eines Leitz-Mikromanipulators wurde eine spitz (< 500 nm Spitzendurchmesser) ausgezogene Glaskapillare unter mikroskopischer Sicht in die gewünschte Region des Schnittpräparates gebracht. Nach dem Einstechen der Elektrode in den Schnitt wurde unter ständiger (ca. 2 Hz) Applikation hyperpolarisierender Strompulse (0.1 nA) der Elektrodenwiderstand abgeglichen. Durch sehr langsames, ruckartiges Vortreiben der Elektrode konnte in Zellnähe eine Zunahme des Elektrodenwiderstandes beobachtet werden und unter Zuhilfenahme eines kurzen, oszillierenden Strompulses („buzz“) wurde versucht, die Zelle zu penetrieren. Nach erfolgreicher Penetration erfolgte die Applikation eines hyperpolarisierenden Stromes, um das Membranpotential der Zelle zu stabilisieren. Für die Messungen wurden nur Zellen akzeptiert, deren Eingangswiderstand > 25 M Ω und deren Ruhemembran negativer als -60 mV war. Nach Stabilisierung der Zelle wurde routinemäßig ein Standardprotokoll zur Erfassung der intrinsischen und synaptischen Eigenschaften der jeweiligen Zelle durchgeführt. Hierdurch war es möglich, Ruhemembranpotential, Eingangswiderstand, Zeitkonstante, Strom-Spannungs-Kennlinie, Akkomodation der Aktionspotentiale sowie Größe, Form und Dauer der exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSPs) bzw. Ströme (EPSCs) zu bestimmen. Das Potenzierungsverhalten der synaptischen Potentiale wurde durch Doppel-Reizung (Interpuls-Intervall 50 und 100 ms) erfaßt. Die intrazellulären Ableitungen wurden je nach Fragestellung sowohl im Brücken- und Stromklemm-Modus („current-clamp“) als auch im Spannungsklemm-Modus („discontinuous single-electrode voltage-clamp“) durchgeführt. Die Zellen wurden dabei bei einem Membranpotential von -70/-75 mV gehalten.

2.6.2.1 Voltage-Clamp und diskontinuierlicher Verstärker

Die Hauptaufgabe des Voltage-Clamp-Verfahrens ist es, Änderungen des Membranpotentials der untersuchten Zelle zu verhindern. Dazu wird in der Spannungsklemme ein Kompensationsstrom erzeugt, der genauso groß ist wie der Strom, der durch die Membran fließt,

diesem aber entgegengerichtet ist. Dies erfolgt durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, bei dem das Membranpotential gemessen und mit dem vorgegebenen Wert - der Sollspannung - verglichen wird. Jeder Unterschied zwischen der Soll- und der tatsächlich gemessenen Membranspannung aktiviert einen Regler, der einen entgegengerichteten Strom in die Zelle injiziert. Dieser Kompensationsstrom wird in Voltage-Clamp-Experimenten gemessen. Er läßt unmittelbar Schlüsse auf die Leitfähigkeit der Membran zu, die unter anderem von den Ionenkanälen oder Ionentransportern bestimmt wird.

Vereinfachend wird davon ausgegangen, die Membran verhielte sich wie ein Ohmscher Widerstand. Dadurch besteht ein linearer Zusammenhang zwischen treibender Spannung und Strom (Ohmsches Gesetz: $U = R \cdot I$). Anstelle des Widerstandes R spricht man anschaulicher von seinem Kehrwert, der Leitfähigkeit ($1/R = g$). Das Ohmsche Gesetz sieht dann wie folgt aus: $U = I/g$ bzw. $I = U \cdot g$.

Die Spannung U kann in diesem Fall genauer als der konstante Abstand der vorgegebenen Sollspannung U_{soll} vom Umkehrpotential U_{rev} der Zellmembran für diejenigen Ionen, die den zu messenden Strom tragen: $U = U_{\text{soll}} - U_{\text{rev}}$. Die obige Gleichung muß also genauer lauten: $I = (U_{\text{soll}} - U_{\text{rev}}) \cdot g$.

Der Strom I ist die wichtigste Meßgröße aller Voltage-Clamp-Verstärker und jede Stromänderung ist unmittelbar proportional zu den Leitfähigkeitsveränderungen.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen intrazellulären Messungen wurde mit einem diskontinuierlichen Verstärker des Typs SEC10L (NPI Instruments, Deutschland) gearbeitet. Der Vorteil dieses Verstärkers liegt vor allem darin, daß die Potentiale unabhängig vom Serienwiderstand zwischen Pipette und Zellinnerem gemessen werden können. Hier wechselt der Verstärker zyklisch zwischen Spannungsmessung und Strominjektion hin und her. Bei jeder Strominjektion entsteht eine Spannung am Serienwiderstand der Elektrode, die aber schneller wieder abklingt als die an der Zellmembran aufgebaute Spannung. Das aktuelle Membranpotential wird vom Verstärker im Intervall zwischen den Strominjektionen gemessen, nachdem die Potentialdifferenz an der Pipette abgeklungen ist. Das diskontinuierliche Signal wird anschließend geglättet und als Strom- und Spannungsmessung zur Verfügung gestellt, d.h. es wird die real an der Elektrodenspitze anliegende Spannung ausgelesen. Auf diese Weise wird der durch den hohen Serienwiderstand (z.B. einer intrazellulären Elektrode) entstehende Spannungsabfall vermieden. Der Serienwiderstand spielt für die Messung keine Rolle. Nachteil dieser Methode ist allerdings, daß das Rauschen gegenüber kontinuierlich arbeitenden Verstärkern erhöht ist.

2.6.2.2 Intrazelluläre Elektroden

Zur intrazellulären Ableitung aus Nervenzellen wurden Elektroden aus dünnwandigen filamenthaltigen Kapillaren (Außendurchmesser: 1.2 mm) an einem horizontalen Elektroden-Ziehgerät der Firma Sutter Instrument Co. in einem Schritt ausgezogen. Die Elektroden spitzen hatten einen Durchmesser $<0.5 \mu\text{m}$, einen elektrischen Widerstand zwischen 30 bis 80 M Ω und waren mit 2.5 M frisch angesetzter Kaliumacetatlösung gefüllt. Auch hier diente ein in die Elektrode eingetauchter chlorierter Silberdraht als Verbindung mit dem Verstärkereingang. Die intrazellulären Ableitungen wurden an Zellen der Schicht III des mEC der Ratte vorgenommen.

2.6.2.3 Exzitatorische Postsynaptische Potentiale (EPSPs) und Ströme (EPSCs)

Die Reizung des IEC führt bei den Zellen zu einer komplexen postsynaptischen Antwort. Durch Zugabe verschiedener Substanzen zur Perfusionslösung lassen sich die durch die verschiedenen Rezeptoren (AMPA, Kainat, NMDA) vermittelten exzitatorischen postsynaptischen Potentiale und Ströme isolieren (Tabelle 4).

Tabelle 4

Pharmakologische Substanzen zur Isolierung der einzelnen EPSCs.

Substanz	Konzentration	Antwort vermittelt durch
APV	60 μM	AMPA-Rezeptoren
Bicuculline methiodide	5 μM	
CGP	1 μM	
erhöhte Mg^{2+} -Konzentration	4 mM	
CNOX oder NBQX	30 μM oder 10 μM	NMDA-Rezeptoren
Bicuculline methiodide	5 μM	
CGP	1 μM	
APV	60 μM	Kainat-Rezeptoren
Bicuculline methiodide	5 μM	
CGP	1 μM	
LY 300164	100 μM	
erhöhte Mg^{2+} -Konzentration	4 mM	

Zusätzlich zu diesen Strömen ließ sich in Gegenwart von APV, Bicuculline, CNQX oder NBQX und CGP eine verbleibende depolarisierende Antwort beobachten. Die AMPA- und

NMDA-vermittelten EPSCs wurden durch Einzelimpulse (Dauer: 50 - 100 μ s) evoziert. Zur Auslösung genügend großer EPSCs für die Kainat- und die verbleibende Antwort wurden vier Stimuli hintereinandergesetzt (300 Hz).

2.6.2.4 Experimentelles Protokoll

Nach Erhalt stabiler Signale und Aufzeichnung der intrinsischen Eigenschaften der Zelle (current-clamp) und der Kontroll-EPSCs (voltage-clamp) erfolgte dann das Einwaschen der verschiedenen Substanzen gemäß dem Protokoll in Tabelle 5. Für die Aufzeichnungen wurden 70 % der Stimulationsintensität benutzt, die zur Auslösung eines maximalen Signals vonnöten gewesen wäre.

Tabelle 5

Experimentelles Protokoll der intrazellulären Messungen.

Experimentierphase	Substanz	Konzentration [μ M]	Einwaschzeit [min]	Bemerkungen
I	<i>L-trans</i> -2,4-PDC	400	20	alle isolierbaren EPSCs
	MCPG	500	20	- " -
	MCPG &	500	20	Vorinkubation;
	<i>L-trans</i> -2,4-PDC	400	15	kombinierte Applikation
II	<i>trans</i> -(\pm)-ACPD	100	20	AMPA-, NMDA-EPSCs
	MCPG &	500	20	Vorinkubation;
	<i>trans</i> -(\pm)-ACPD	100	15	kombinierte Applikation
III	EGLU	200	20	gemischte EPSCs (nur GABA-Rezeptoren blockiert)
	EGLU &	200	15	Vorinkubation;
	<i>L-trans</i> -2,4-PDC	400	15	kombinierte Applikation
IV	DL-TBOA	150	15	gemischte EPSPs; AMPA-EPSCs
	MCPG &	500	20	Vorinkubation;
	DL-TBOA	150	15	kombinierte Applikation
	EGLU &	200	15	Vorinkubation;
	DL-TBOA	150	15	kombinierte Applikation

2.6.2.5 Analyse der EPSCs

Zur Auswertung der exzitatorischen Ströme wurden folgende Parameter herangezogen: die Latenzzeit bis zum Erreichen des Amplitudenmaximums, die 10-90%-Anstiegszeit der Amplitude, die maximale Amplitude und die Abklingzeitkonstante. Für die "offline"-Auswertung der Daten kamen die Programme Wintida 3.0 (Heka, Germany) und Spike 2 (CED, UK) zur Anwendung. Die Daten entsprechen Mittelwerten von 6-10 Durchläufen pro Aufnahme und sind als Mittelwert \pm S.E.M. dargestellt. Die Abschätzung der Abklingzeitkonstante der EPSCs erfolgte durch Anlegen der Funktion $I(t) = I_0 - I_0(1 - e^{-t/\tau})$, wobei I_0 der Startpunkt, t die Zeit und τ die Zeitkonstante sind. Zur Ermittlung statistischer Signifikanzen wurden der Wilcoxon- und der Student's t Test (SPSS Inc., USA; GraphPad Prism Inc., USA) sowie bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen die ANOVA-Varianzanalyse (GraphPad Prism Inc., USA) herangezogen. Auch hier wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ als signifikant angesehen.

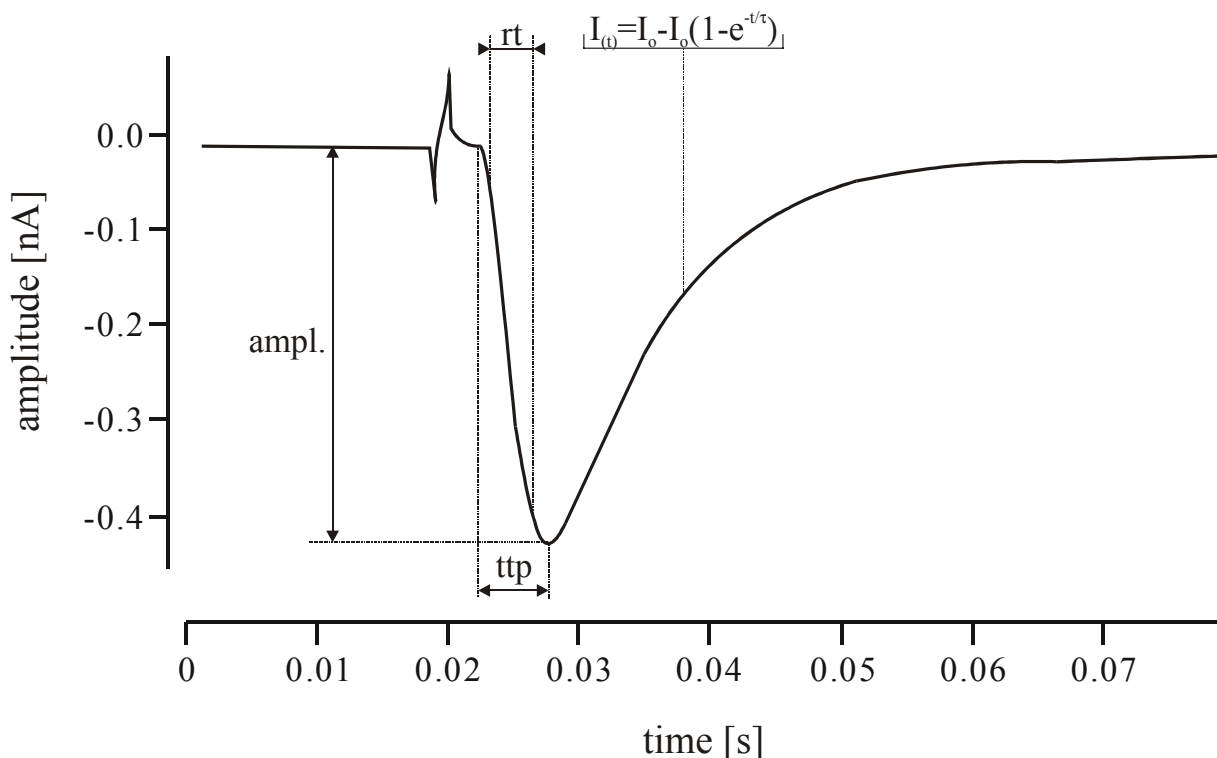


Abbildung 9

Schematische Darstellung eines EPSCs. Eingezeichnet sind die Parameter, die zur Auswertung herangezogen wurden. Dabei bezeichnet 'ampl.' das Amplitudenmaximum, 'ttp' die Zeit, die zum Erreichen des Amplitudenmaximums benötigt wurde, 'rt' ist die 10-90%-Anstiegszeit und durch die Funktion $I(t) = I_0 - I_0(1 - e^{-t/\tau})$ ließ sich die Abfallszeitkonstante ermitteln.

2.6.3 Die Patch-Clamp-Ableitungen

Mittels Patch-Clamp-Technik wurde in der Voltage-Clamp-Konfiguration an den Hirnschnitten "blind" die Spontantaktivität der Zellen erfaßt (Blanton *et al.*, 1989). Die Pipette wurde dabei ohne optische Darstellung einzelner Zellen in den Hirnschnitt hineinbewegt. Kam es nach Aufsetzen auf einer Zellmembran zum Anstieg des Pipettenwiderstandes, erfolgte die Sealbildung. Bei der Bildung eines Seals wird durch Unterdruck in der Patchpipette ein hoher Abdichtwiderstand (Seal) zwischen Membran und Glas gebildet. Bei dem sich an die Sealbildung anschließenden Übergang in die Ganzzellkonfiguration wurde versucht, durch kurzzeitige Applikation eines stärkeren Unterdruckes die unter der Pipette befindliche Membran bei Erhaltung des Abdichtwiderstandes zu zerstören, um somit eine direkte Verbindung zwischen Pipettenlösung und Zellinnerem zu erreichen. Die EPSCs wurden bei einem Membranpotential von -70 mV, das entspricht unter den gegebenen experimentellen Bedingungen dem Umkehrpotential des GABA_A-Rezeptors, isoliert gemessen.

2.6.3.1 Patch-Clamp-Elektroden

Die Patchpipetten wurden aus filamenthaltigem Borosilikatglas (Außendurchmesser: 2 mm) in sechs Stufen mit Hilfe eines horizontalen Elektroden-Ziehgerätes (Sutter Instruments Company, Novato, USA) hergestellt. Die Elektroden wurden in den meisten Fällen feuerpoliert und mit einer Cäsiumgluconatlösung gefüllt. Zur Aufnahme der mEPSCs (konventionelle Ganzzellaufleitung) hatten die Pipetten nach Füllung mit Cäsiumgluconat einen Widerstand von 4 bis 8 M Ω .

2.6.3.2 Spontane exzitatorische Miniaturströme (mEPSCs)

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik spontane Miniaturströme (mEPSCs) der Zellen aufgenommen. Die Zellen wurden wiederum bei einem Membranpotential von -70 mV gehalten. Die Analyse der Frequenz und der Amplitudenverteilung dieser spontan auftretenden mEPSCs kann zusätzliche Informationen über Veränderungen der präsynaptischen Transmitterfreisetzung und/oder die Sensitivität der postsynaptischen Rezeptoren vermitteln (Malgaroli & Tsien, 1992; Manabe *et al.*, 1992; Wyllie *et al.*, 1994).

Für die Messungen wurde ein EPC7 (Heka, List, Darmstadt, Deutschland) als Verstärker verwendet. Die exzitatorischen Miniaturströme wurden durch Badapplikation von Bicuculline

(5 μM), CGP (1 μM) und TTX (1 μM) isoliert und "online" entweder mit dem internen Besselfilter des Verstärkers bei Frequenzen von 10 bzw. 3 kHz oder mit einem 8-pol Besselfilter bei Frequenzen zwischen 1-10 kHz gefiltert. Die Versuchssteuerung und Auswertung erfolgte auf einem IBM-kompatiblen PC in Verbindung mit dem Programm ISO2 (MFK, Niedernhausen, Deutschland). Die Messungen wurden über eine 12-bit AD-Karte mit unterschiedlichen Sammelraten (50-200 μs) direkt auf der Festplatte des PCs gespeichert und gleichzeitig auf ein Videoband aufgezeichnet. Zur Auswertung konnten die Messungen "offline" mit einem Gauß-Algorithmus weiter gefiltert werden. Die Daten sind als Mittelwert \pm S.E.M. dargestellt. Zur Ermittlung statistischer Signifikanzen wurden der Wilcoxon- und der Student's t Test (SPSS Inc., USA; GraphPad Prism Inc., USA) herangezogen. Auch hier wurde eine Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Jedes Hirnschnittpräparat wurde vor Beginn der geplanten Experimente mittels reizinduzierter Feldpotentialantworten auf seine Vitalität geprüft. Aufbauend darauf erfolgte dann die Selektion der Hirnschnitte für weitere extra- und intrazelluläre sowie für Patch-Clamp-Ableitungen.

3.1 Feldpotentiale der Ratte

Für die folgenden Untersuchungen wurden Feldpotentiale der Schichten III und V herangezogen. Stimulationen der oberflächlichen Schichten des lateralen entorhinalen Cortex (IEC) resultieren in komplexen Feldpotentialantworten in der oberflächlichen (III) und den tiefen Schichten (V bis VI) des medialen entorhinalen Cortex. Diese setzen sich aus folgenden Komponenten zusammen: einem kurzen frühen negativen Potential, das von einem positiven und einem späten langen negativen Potential gefolgt wird. In beiden Schichten erreichte das frühe negative Potential sein Maximum ca. 5 ms nach der Stimulation mit einer Amplitude von -2.24 ± 0.1 mV in der Schicht III und -1.21 ± 0.2 mV in Schicht V. Das nachfolgende positive Potential erreichte seinen Höchstwert ungefähr 12 ms nach der Stimulation und hatte in den Schichten III und V eine mittlere Amplitude von 0.38 ± 0.1 mV bzw. 0.28 ± 0.07 mV. Erst nach ca. 50 ms konnte dann das Amplitudenmaximum des späten langen negativen Potentials (ca. -0.21 ± 0.03 mV, Schicht III und V) abgelesen werden. Für alle nachfolgenden Untersuchungen der Feldpotentiale wurden nur solche Hirnschnitte berücksichtigt, die nach dem Auswaschen der jeweiligen Substanzen zumindest eine teilweise Erholung der Feldpotentiale aufwiesen.

3.1.1 Einfluß der Glutamat-Uptake-Inhibitoren auf evozierte Feldpotentiale der Schichten III und V des mEC

3.1.1.1 Dihydrokainat

Nach der Aufnahme stabiler Feldpotentiale wurde Dihydrokainat (DHK) in einer Konzentration von 200 μ M für 60 min über das Bad appliziert. In Abbildung 10 ist ein typisches Experiment für die Schichten III und V bei maximaler Stimulationsintensität dargestellt.

Unter 200 μM DHK konnte unabhängig von der Stimulationsintensität in Schicht III eine signifikante Abnahme der Amplituden der ersten und zweiten negativen Komponente um einen mittleren Prozentsatz von $35.07 \pm 11.29 \%$ bzw. $85.19 \pm 50 \%$ beobachtet werden. In der Schicht V lag die signifikante mittlere Amplitudenabnahme für die frühe Komponente bei $40.95 \pm 21.75 \%$ und für die späte negative Komponente bei $85.60 \pm 55.56 \%$.

Im Gegensatz zu den negativen Komponenten der Feldpotentiale, vergrößerte sich die Amplitude der dazwischenliegenden positiven Komponente beider Schichten. In Schicht III nahm die Amplitude signifikant um den mittleren Wert von $105.14 \pm 11.11 \%$ und in Schicht V, wenn auch nicht signifikant, um $69.23 \pm 25.16 \%$ zu. Die Zeiten zu den jeweiligen Amplitudenmaxima wiesen in beiden Schichten und unabhängig von den Stimulationsintensitäten keine Veränderungen auf.

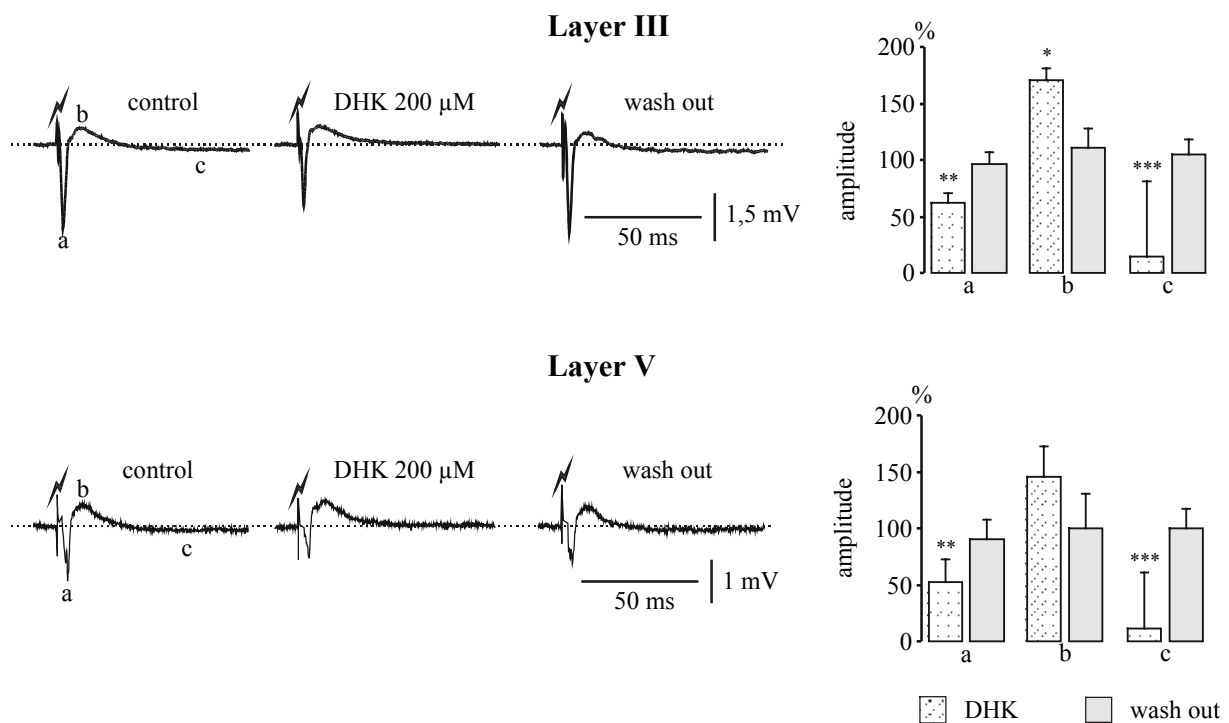


Abbildung 10

Feldpotentialantworten der Schichten III (Layer III) und V (Layer V) bei maximaler Stimulation vor (control) und nach der Applikation von 200 μM DHK sowie nach dem Auswaschen der Substanz (wash out). Die kleinen Buchstaben an den Kontrollantworten zeigen die verschiedenen Komponenten der Feldpotentiale: a, erste negative Komponente; b, positive Komponente; c, zweite negative Komponente. In den nebenstehenden Balkendiagrammen sind der Effekt von DHK auf die einzelnen Komponenten und das Auswaschen gegen die Kontrollwerte prozentual aufgetragen. Die Kontrollamplituden entsprechen 100% und sind durch die Ordinate repräsentiert. Die eingetragenen Balken beziehen sich auf die für den jeweiligen Versuch gültigen Kontrollversuche, ebenso die statistischen Vergleiche. Untersucht wurden je sechs Hirnschnitte und dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

Bei der doppelten Konzentration von DHK (400 μM) zeigten sich signifikante Effekte schon nach der wesentlich kürzeren Applikationszeit von 15 min. Ein typisches Experiment für diese Konzentration ist in Abbildung 11 zu sehen. Ebenfalls unabhängig von der Stimulationsintensität verminderten sich die Amplituden der zwei negativen Komponenten der Schicht III signifikant um einen mittleren Prozentsatz von 53.60 ± 21.33 % bzw. 85.95 ± 61.11 % (1. bzw. 2. negatives Potential) und die der Schicht V um 58.26 ± 22.79 % bzw. 76.83 ± 58.89 % (1. bzw. 2. negatives Potential). In Kontrast zu der Amplitudenvergrößerung der positiven Komponente unter 200 μM DHK kam es bei dieser Konzentration zu einer nicht-signifikanten Abnahme dieser Amplituden. In der Schicht III lag diese Abnahme im Mittel bei 37.47 ± 27.76 % und in Schicht V bei 42.27 ± 42.22 %. Wie schon bei der niedrigeren Konzentration blieben auch hier die Zeiten bis zum Erreichen der jeweiligen Amplitudenmaxima unverändert.

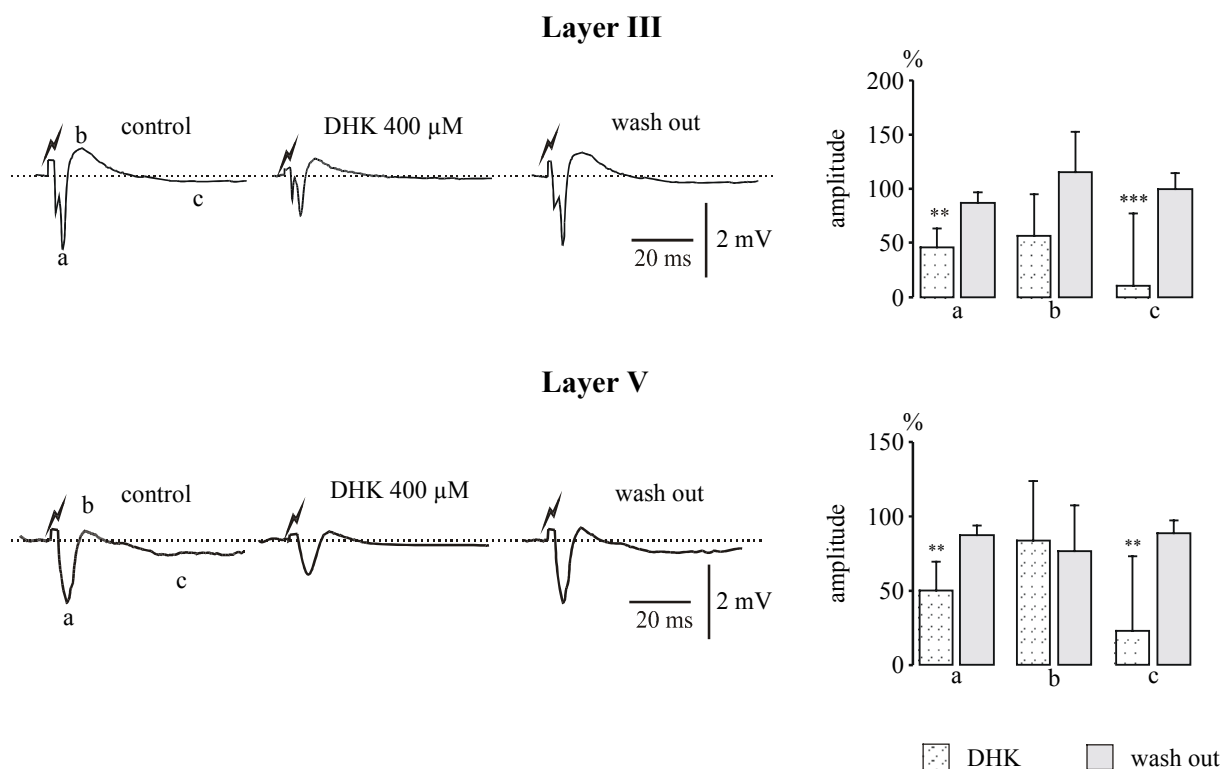


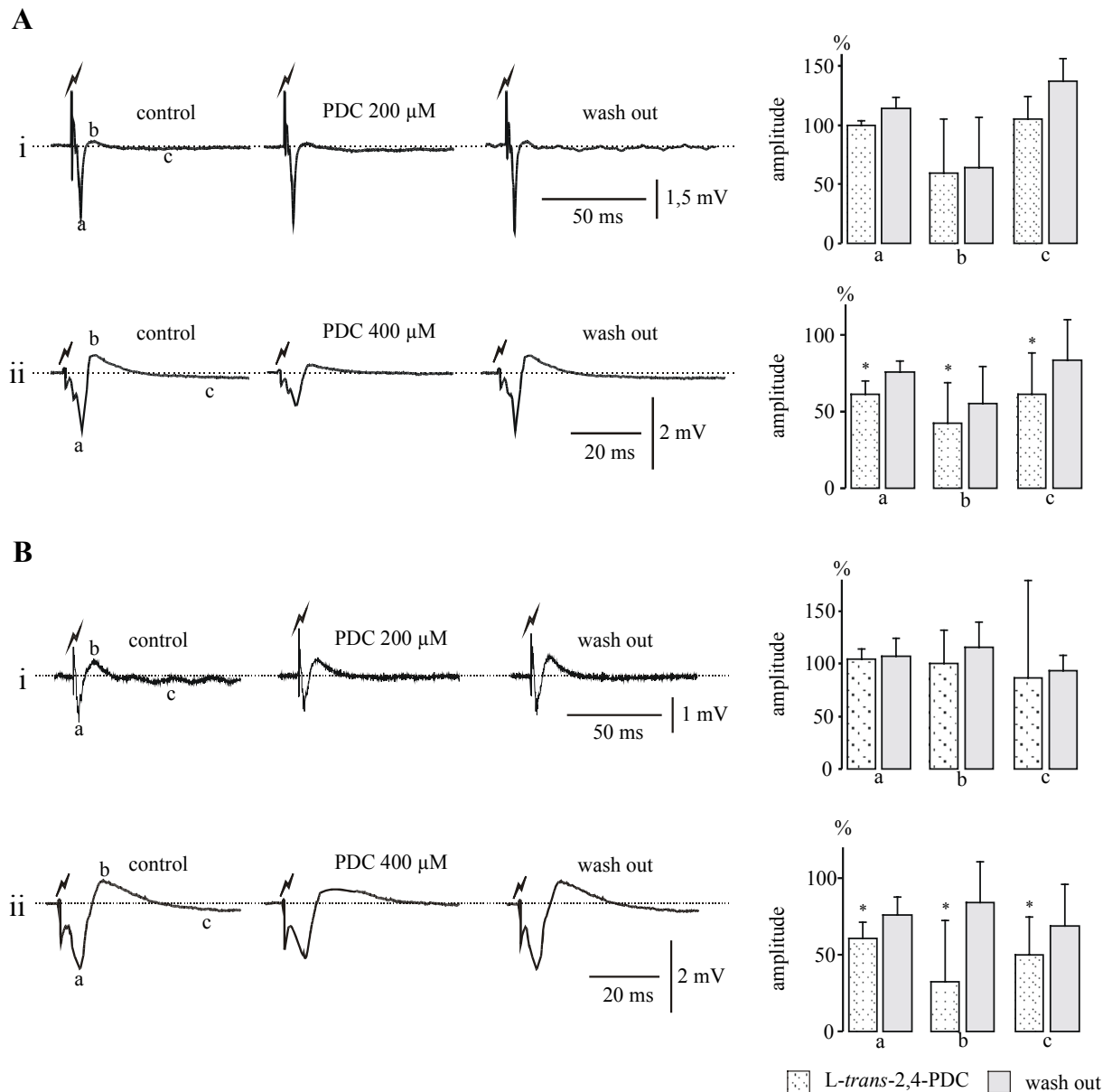
Abbildung 11

Feldpotentialantworten der Schichten III (Layer III) und V (Layer V) bei maximaler Stimulation vor (control) und nach der Applikation von 400 μM DHK sowie nach dem Auswaschen der Substanz (wash out). Die kleinen Buchstaben zeigen wieder die verschiedenen Feldpotentialkomponenten an: a und c, 1. und 2. negative Komponente; b, positive Komponente. Die nebenstehenden Balkendiagramme zeigen den Effekt von DHK auf die einzelnen Komponenten und das Auswaschen. Die Kontrollamplituden entsprechen 100% und sind an der Ordinate aufgetragen. Untersucht wurden je sechs Hirnschnitte und prozentual dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

3.1.1.2 L-trans-Pyrrolidine-2,4-Dicarboxylat

Da Dihydrokainat auch an die postsynaptischen Glutamatrezeptoren binden kann (Maki *et al.*, 1994), wurde für diese Untersuchungen noch ein zweiter Transport-Inhibitor, das L-trans-Pyrrolidine-2,4-Dicarboxylat (L-trans-2,4-PDC) benutzt. Wie schon DHK wurde auch L-trans-2,4-PDC zunächst für 60 min in einer Konzentration von 200 μM über das Bad appliziert. Anders jedoch als unter DHK zeigten sich keinerlei bzw. minimale Amplitudenveränderungen der frühen und späten negativen Komponente in den Feldpotentialen beider Schichten. Ein typisches Experiment ist in Abbildung 12 (Ai, Bi) dargestellt. Ein weiterer Unterschied zeigte sich hinsichtlich der positiven Komponente, bei der unter L-trans-2,4-PDC eher eine Amplitudenverminderung bzw. keine Amplitudenveränderung registriert werden konnte (Abb. 12 Ai, Bi). In der Schicht III lag diese nicht-signifikante Abnahme in Abhängigkeit von der Stimulationsintensität im Mittel bei $27.12 \pm 42.31 \%$ und in Schicht V bei $4.81 \pm 41.37 \%$. Auch bei diesem Transportinhibitor blieben die Zeiten bis zum Erreichen der Amplitudenmaxima unbeeinflusst.

Im Gegensatz zu den unter 200 μM L-trans-2,4-PDC gewonnenen Daten, zeigte sich unter der höheren Konzentration (400 μM) nach 15 min Applikationszeit in beiden Schichten ein signifikanter Effekt auf sämtliche Amplituden unabhängig von der Stimulationsintensität (Abb. 12 Aii, Bii). Die Amplitude des frühen negativen Potentials nahm in den Schichten III und V um einen mittleren Prozentsatz von $44.37 \pm 10.84 \%$ bzw. $48.21 \pm 20.97 \%$ ab und die Amplitudenabnahme der späten negativen Komponente lag bei einem mittleren Wert von $52.55 \pm 28.93 \%$ in der Schicht III und in Schicht V bei $66.67 \pm 37.50 \%$. Im Gegensatz zu den DHK-Daten konnte unter L-trans-2,4-PDC auch bei der positiven Komponente eine signifikante Amplitudenabnahme beobachtet werden, die in der Schicht III um den mittleren Prozentsatz von $66.29 \pm 52.58 \%$ und in der Schicht V um $77.61 \pm 43.33 \%$ verringert war. Auch unter 400 μM L-trans-2,4-PDC blieben die Zeiten bis zum Erreichen der Amplitudenmaxima unverändert.

**Abbildung 12**

Maximale Feldpotentialantworten der Schichten III (A) und V (B) vor und nach der Applikation von 200 μM (i) und 400 μM (ii) L-trans-2,4-PDC (PDC) sowie nach dem Auswaschen der Substanz. Die kleinen Buchstaben an den Kontrollantworten zeigen die verschiedenen Komponenten der Feldpotentiale: a und c, 1. und 2. negative Komponente; b, positive Komponente. In den nebenstehenden Balkendiagrammen sind der Effekt von L-trans-2,4-PDC auf die einzelnen Komponenten und das Auswaschen gegen die Kontrollwerte prozentual aufgetragen. Die Kontrollamplituden sind durch die Ordinate repräsentiert und entsprechen 100 %. Untersucht wurden je sechs Hirnschnitte und dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

Innerhalb der Untersuchungen zu einem Glutamat-Uptake-Inhibitor und den verwendeten Konzentrationen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Effekten auf die Feldpotentiale der Schichten III und V festgestellt werden.

3.2 Intrazelluläre Ableitungen an Neuronen der Ratte

Dihydrokainat ist im Vergleich zu *L-trans*-2,4-PDC der schwächere Inhibitor des Glutamat-Transportes und ruft zudem auch einen starken Einwärtsstrom (525 ± 189 pA) hervor (Maki *et al.*, 1994). Dieser Einwärtsstrom, der für eine direkte Aktivierung postsynaptischer Glutamatrezeptoren spricht, konnte durch eigene Messungen bestätigt werden. Nach 15-minütigem Einwaschen von 400 μ M DHK betrug der Einwärtsstrom 386 ± 68 pA. Aus diesem Grund wurden bei den nachfolgenden Messungen nur *L-trans*-2,4-PDC und DL-TBOA als Inhibitor der Glutamat-Transporter verwendet.

Im entorhinalen Cortex lassen sich folgende exzitatorische glutamaterge Komponenten pharmakologisch isolieren: eine (\pm)- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA-), eine Kainat- und eine *N*-methyl-D-aspartate (NMDA-) vermittelte Antwort. Zusätzlich konnte durch kurze repetitive Reizung eine verbleibende depolarisierende Antwort evoziert werden.

3.2.1 Einfluß von *L-trans*-2,4-PDC auf Neurone der Schicht III des medialen entorhinalen Cortex

3.2.1.1 Intrinsische Eigenschaften

In keiner der untersuchten Zellen ($n=7$) konnte nach Applikation von *L-trans*-2,4-PDC ein signifikanter Effekt auf den Eingangswiderstand, die Strom-Spannungskurve oder das Akkomodationsverhalten beobachtet werden. In Abbildung 13 sind die typischen intrinsischen Merkmale anhand einzelner (13 A, C) und mehrerer Zellen (13 B, D) dargestellt. Der Eingangswiderstand verringerte sich geringfügig von 32.38 ± 3.34 M Ω unter Kontrollbedingungen auf 29.41 ± 4.50 M Ω (Wilcoxon, $p>0.2$). Des weiteren kam es nach Applikation von *L-trans*-2,4-PDC zu einer minimalen nicht-signifikanten Verschiebung der Strom-Spannungskurve (Wilcoxon; $p>0.6$). Ebenfalls weitestgehend unbeeinflusst blieb das Akkomodationsverhalten der untersuchten Zellen. Unter *L-trans*-2,4-PDC kam es zu einer geringfügigen nicht-signifikanten Erniedrigung der Spikefrequenz von 28.02 ± 4.79 Hz auf 25.99 ± 4.19 Hz ($p>0.3$).

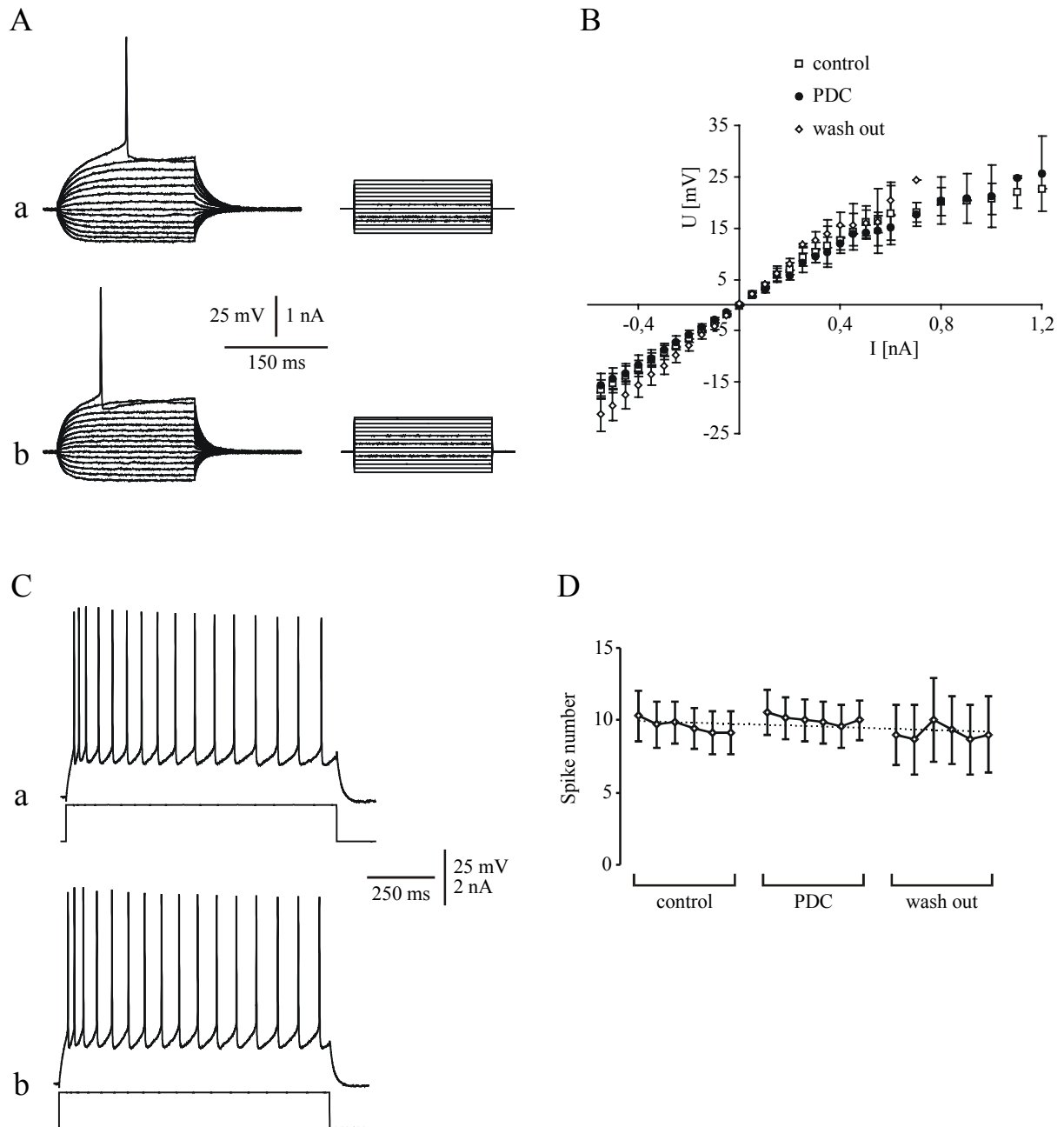


Abbildung 13

Intrinsische Zelleigenschaften nach der Applikation *L-trans*-2,4-PDC. In A und B ist zu sehen, daß sich das Strom-Spannungsverhalten der Zellen nur unwesentlich verändert. Die Antworten auf hyper- und depolarisierende Strompulse (rechts) sind vor (Aa) und nach der Applikation von *L-trans*-2,4-PDC (Ab) unverändert. In Abbildung B ist dieses Verhalten deutlicher zu erkennen. Dargestellt ist eine gemittelte Strom-Spannungskurve ($n=7$). In C ist zu erkennen, daß sich auch das Akkomodationsverhalten der Zellen vor (Ca) und nach der Applikation von *L-trans*-2,4-PDC (Cb) bei gleicher Strominjektion nicht ändert. Es wurden immer sechs Strominjektionen im Abstand von 15 s gegeben. In (D) ist die gemittelte Anzahl der Aktionspotentiale von sieben Zellen unter Kontrolle, *L-trans*-2,4-PDC und nach dem Auswaschen der Substanz aufgetragen.

3.2.1.2 Einfluß auf die exzitatorischen postsynaptischen Ströme (EPSCs)

Bei der Perfusion der Schnitte mit *L-trans*-2,4-PDC konnte keine Induzierung eines Einwärtsstromes beobachtet werden, wohl aber eine signifikante Reduktion der Amplituden der verschiedenen EPSCs. Die Amplituden der AMPA- und der NMDA-Antwort (Abb. 14) wurden um $33.5 \pm 4.5 \%$ ($n=11$; $p<0.001$) bzw. $29.8 \pm 4.2 \%$ ($n=9$; $p<0.02$) reduziert und die der Kainat-vermittelten und verbleibenden EPSCs um $30.7 \pm 4.6 \%$ ($n=6$; $p<0.05$; Abb. 15A) bzw. $25.5 \pm 10.1 \%$ ($n=6$; $p<0.03$; Abb. 15B). Die prozentuale Reduktion der EPSC-Amplituden aller isolierten Komponenten wies im Vergleich zwischen den Gruppen keinen signifikanten Unterschied auf (one-way ANOVA, $p>0.8$).

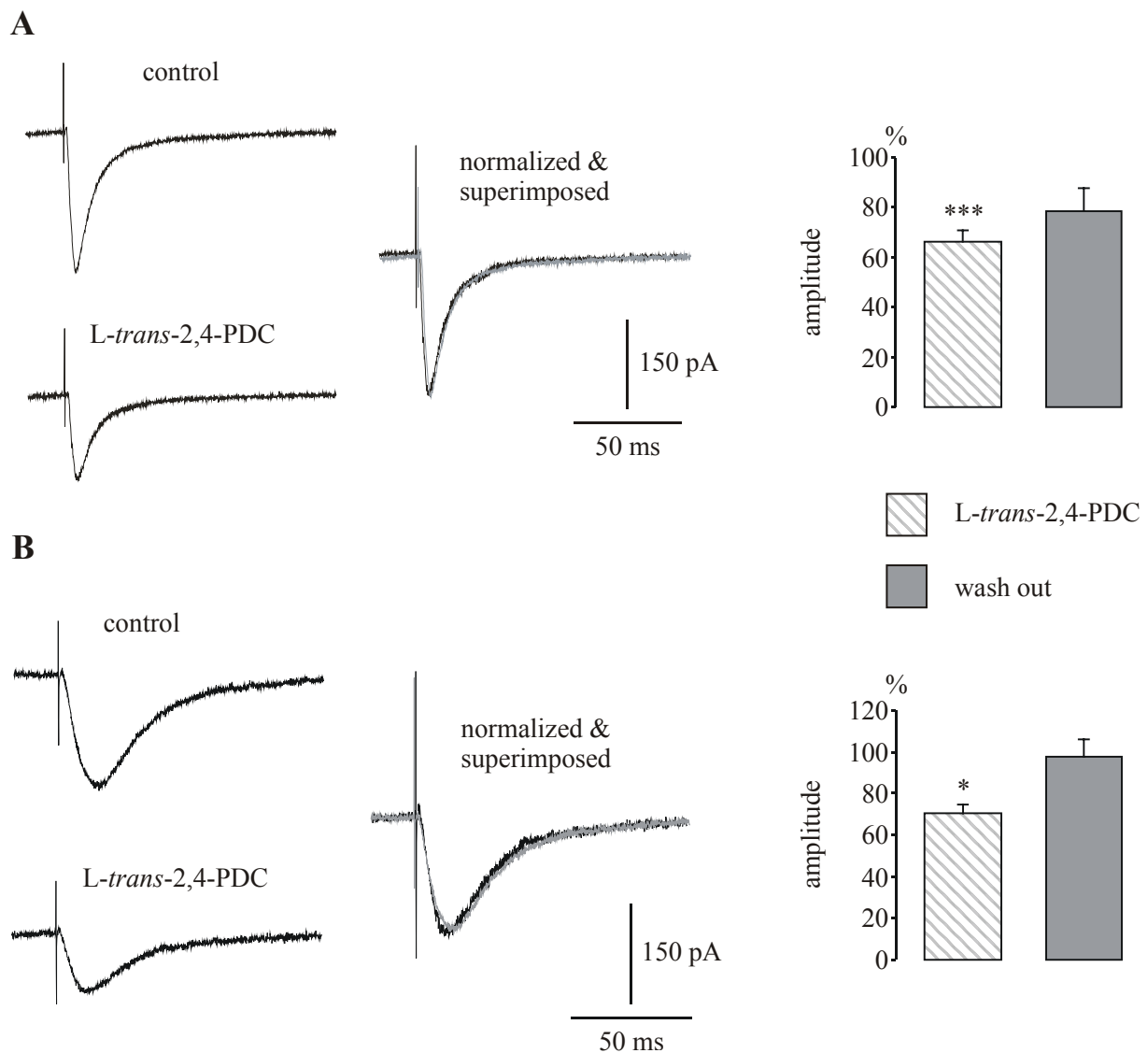
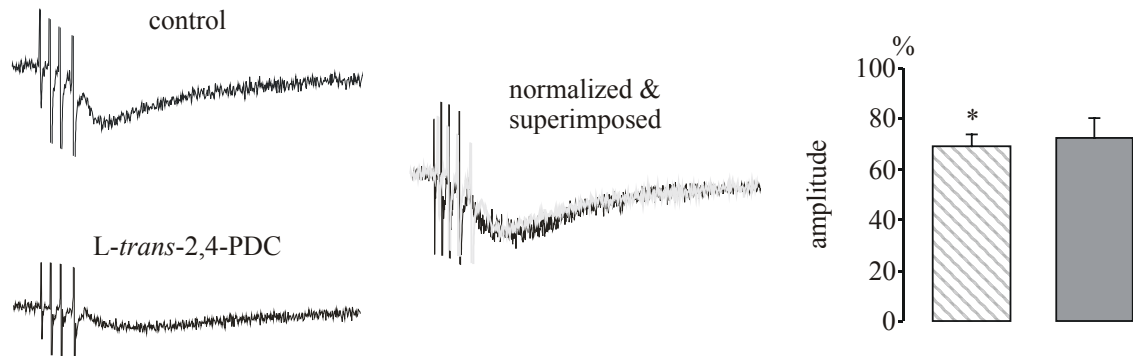


Abbildung 14

Effekt von *L-trans*-2,4-PDC auf die Amplituden der AMPA- (A) und NMDA-vermittelten (B) EPSCs. Wichtig ist vor allem die Tatsache, daß *L-trans*-2,4-PDC die Amplituden der verschiedenen EPSCs um ungefähr den gleichen Wert reduziert. Um die unveränderte Kinetik der synaptischen Ströme zu verdeutlichen, wurden in den rechten Abbildungen die Amplituden normalisiert. Nebenstehend sind die prozentualen Veränderungen unter *L-trans*-2,4-PDC und nach dem Auswaschen gegen die Kontrolle (100%) aufgetragen. *: $p<0.05$; ***: $p<0.001$

Im Gegensatz zu den Amplituden konnte weder bei den Abfallszeitkonstanten ($p>0.4$), noch den Latenzzeiten ($p>0.9$) und den 10-90%-Anstiegszeiten der EPSCs ($p>0.6$) eine signifikante Änderung in Gegenwart von *L-trans*-2,4-PDC festgestellt werden.

A



B

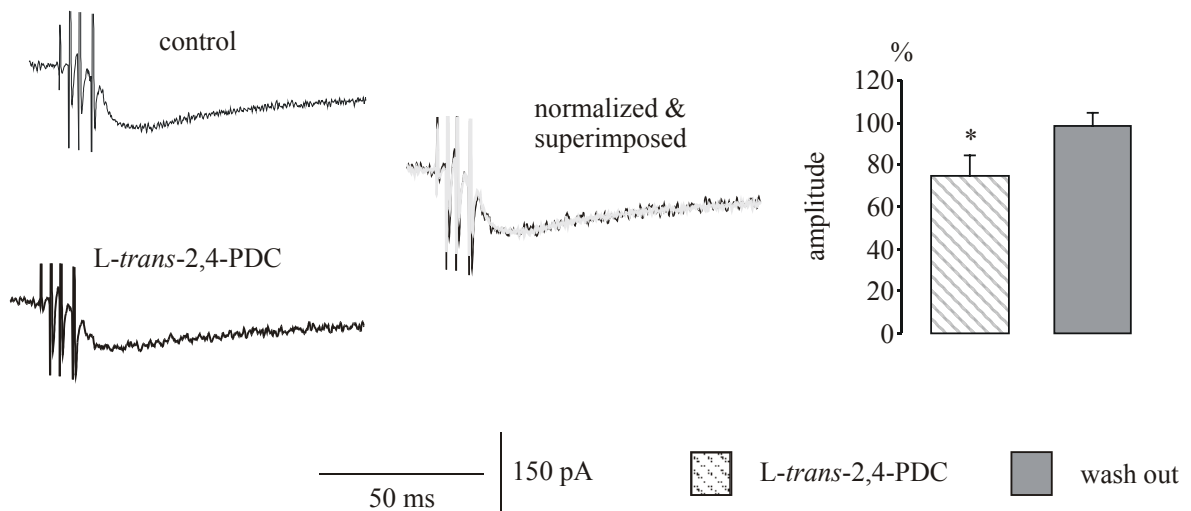


Abbildung 15

Effekt von *L-trans*-2,4-PDC auf die Amplituden der Kainat-vermittelten (A) und verbleibenden (B) EPSCs. Die Amplitudenreduktion erfolgt in annähernd dem gleichem Umfang. Erneut wurden in den rechten Abbildungen die Amplituden der Originaldaten normalisiert, um die unveränderte Kinetik der synaptischen Ströme zu veranschaulichen. Die prozentualen Veränderungen unter *L-trans*-2,4-PDC und nach dem Auswaschen sind nebenstehend gegen die Kontrolle (100%) aufgetragen. *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$

3.2.1.3 Einfluß auf AMPA- und NMDA-EPSCs nach Doppelpuls-Reizung

Die Analyse der Beziehung zwischen dem ersten und zweiten EPSC und dem daraus resultierendem Doppelpuls-Index ($PPI = \text{zweite/erste Amplitude}$) kann Aufschluß über Veränderungen der Sensitivität postsynaptischer Rezeptoren und/oder Änderungen der präsynaptischen Transmitterfreisetzung geben. Die für diese Messungen benötigten Doppelpulse wurden in einem Abstand von 50 und 100 ms gegeben. Bei diesen Interpuls-Abständen sind die Än-

derungen des PPI für AMPA- und NMDA-EPSCs am stärksten ausgeprägt (Clark *et al.*, 1994; Zorumski *et al.*, 1996).

Für die durch Doppelpulse evozierten AMPA- und NMDA-EPSCs gilt, daß das zweite EPSC immer größer war als das erste. Bei einem Intervall von 50 ms lag der PPI für die AMPA-vermittelten EPSCs bei 1.38 ± 0.05 und zeigte keine Veränderung unter Applikation von *L-trans*-2,4-PDC (1.40 ± 0.06 ; $n=10$; $p>0.5$). Ebenso unverändert blieb der PPI für die NMDA-vermittelten EPSCs (Kontrolle: 1.97 ± 0.11 , *L-trans*-2,4-PDC: 1.95 ± 0.11 ; $n=8$; $p>0.6$). Ein ähnliches Bild ergab sich bei Untersuchungen mit einem Intervall von 100 ms. Die PPI wurden in beiden Fällen nicht signifikant verändert. Unter Applikation von *L-trans*-2,4-PDC lag der PPI für die AMPA-EPSCs bei 1.26 ± 0.09 (Kontrolle: 1.23 ± 0.05 ; $n=10$; $p>0.7$) und für die NMDA-EPSCs bei 1.43 ± 0.07 (Kontrolle: 1.40 ± 0.08 ; $n=8$; $p>0.7$).

Da keine Unterschiede auf die Beeinflussung des PPI in Abhängigkeit von den Intervallen festgestellt wurden, wird in der weiteren Arbeit nur der 50 ms-Abstand berücksichtigt.

3.2.2 Einfluß der kombinierten Applikation von MCPG und *L-trans*-2,4-PDC auf Neurone der Schicht III des medialen entorhinalen Cortex

Es wurde angenommen, daß es durch die Inhibition der Glutamat-Transporter zu einer Ansammlung von Glutamat im synaptischen Spalt kommt. Dieser Glutamatüberschuß könnte zu einer Diffusion von Glutamat aus dem synaptischen Spalt führen und sowohl prä- als auch postsynaptische metabotrope Glutamatrezeptoren aktivieren. Da MCPG als Antagonist an einem Großteil dieser glutamatergen Autorezeptoren (Gruppe I und II mGluRs) wirkt, wurde es für die folgenden Messungen benutzt.

3.2.2.1 Eigeneffekt von MCPG

Da MCPG ein kompetitiver Antagonist der metabotropen GluRs ist, wurden die Hirnschnitte mit 500 μ M MCPG für 20 min vorinkubiert. Dabei stellte sich heraus, daß MCPG einen Eigeneffekt auf die evozierten EPSCs hatte. Ein typisches Beispiel dafür ist in Abbildung 16 anhand der AMPA- und NMDA-vermittelten EPSCs dargestellt. Vergleichbar zu den Daten, die unter Applikation von *L-trans*-2,4-PDC gewonnen wurden, hatte MCPG keinen signifikanten Einfluß auf die intrinsischen Eigenschaften der Zellen. Dafür kam es unter Applikation von MCPG zu einer signifikanten Amplitudenreduktion der EPSCs. Die Amplituden der AMPA- ($n=10$; Abb. 16A) und NMDA-vermittelten ($n=10$; Abb. 16B) EPSCs verringert-

ten sich signifikant um $23.1 \pm 5.3\%$ bzw. $19.7 \pm 4.5\%$ ($p < 0.01$). Ähnliches ließ sich für die Amplituden der Kainat- und verbleibenden Antwort (je $n=6$) beobachten. Hier wurden die Amplituden signifikant um $26 \pm 4.4\%$ und $13.7 \pm 5.9\%$ reduziert. Erneut konnte zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied in der durch MCPG verursachten Amplitudenreduktion festgestellt werden ($p > 0.2$). Bezüglich der übrigen Parameter (Abfallszeitkonstante, Latenzzeit und 10-90%-Anstiegszeit) konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

Für die nachfolgenden Untersuchungen bedeutete dies, daß die kombinierte Applikation der Substanzen erst nach dem Erhalt stabiler synaptischer Antworten unter MCPG erfolgen konnte.

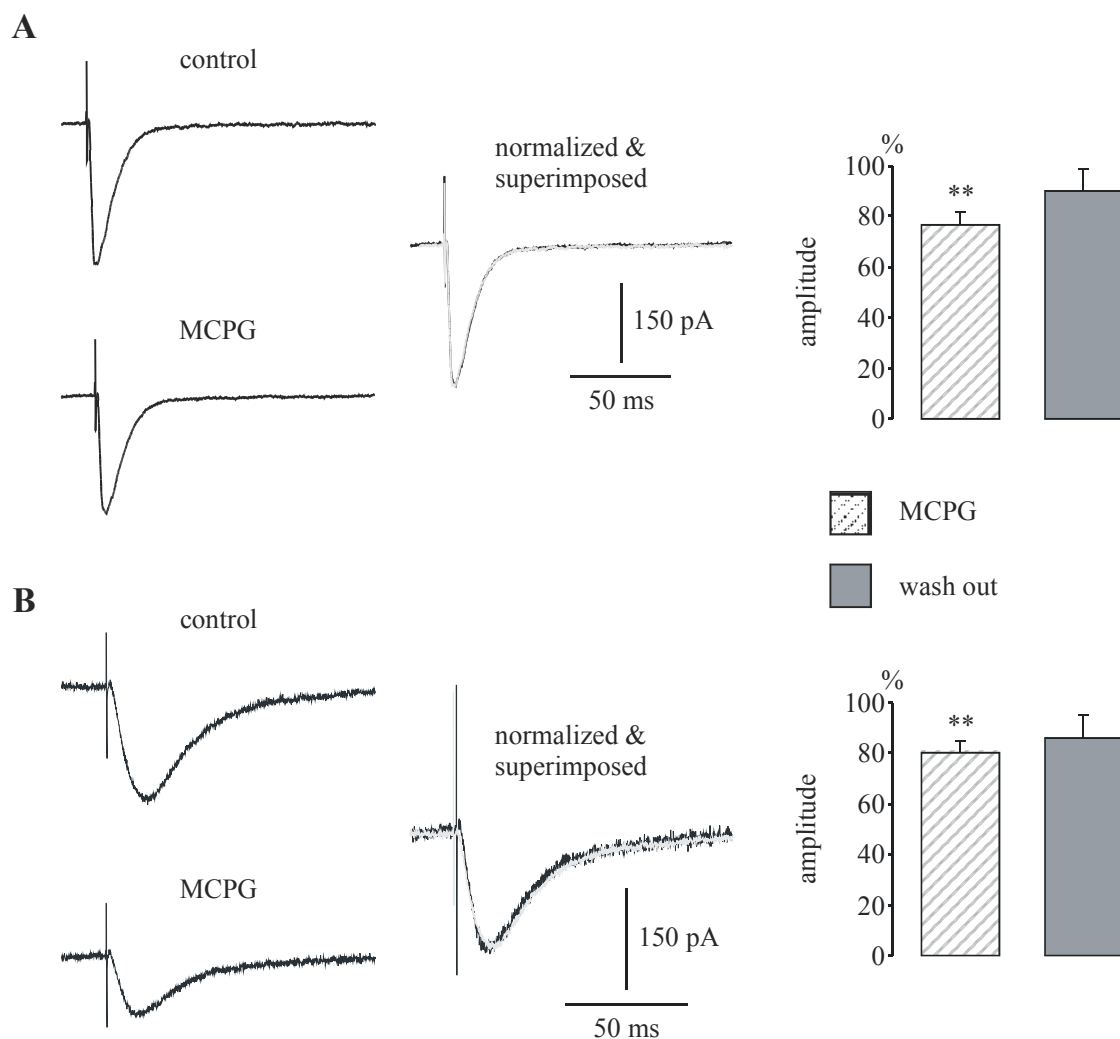


Abbildung 16

Einfluß von MCPG auf die EPSC-Amplituden. Stellvertretend sind hier die AMPA- (A) und NMDA-vermittelten (B) EPSCs dargestellt. MCPG hatte keinen Einfluß auf die Kinetik der synaptischen Ströme (rechte Registrierungen, Amplituden normalisiert). In den Balkendiagrammen sind die prozentualen Amplituden unter MCPG und nach dem Auswaschen gegen die Kontrolle (100%) aufgetragen. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

3.2.2.2 Einfluß auf die EPSCs nach kombinierter Applikation

In Gegenwart von MCPG kam es unter *L-trans*-2,4-PDC nur noch zu einer geringfügigen nicht-signifikanten Amplitudenreduktion von $12.9 \pm 3.7\%$ bzw. $12.9 \pm 5\%$ der AMPA- bzw. NMDA-EPSCs (jeweils $n=8$; $p>0.1$; Abb. 17 A, B) und von $10.9 \pm 7.1\%$ bzw. $12.2 \pm 4.9\%$ bei der Kainat- ($n=8$; $p>0.1$) und der verbleibenden Antwort ($n=7$; $p>0.3$). Erneut konnte zwischen den einzelnen Gruppen kein signifikanter Unterschied in der Reduktion der Amplituden festgestellt werden ($p>0.3$).

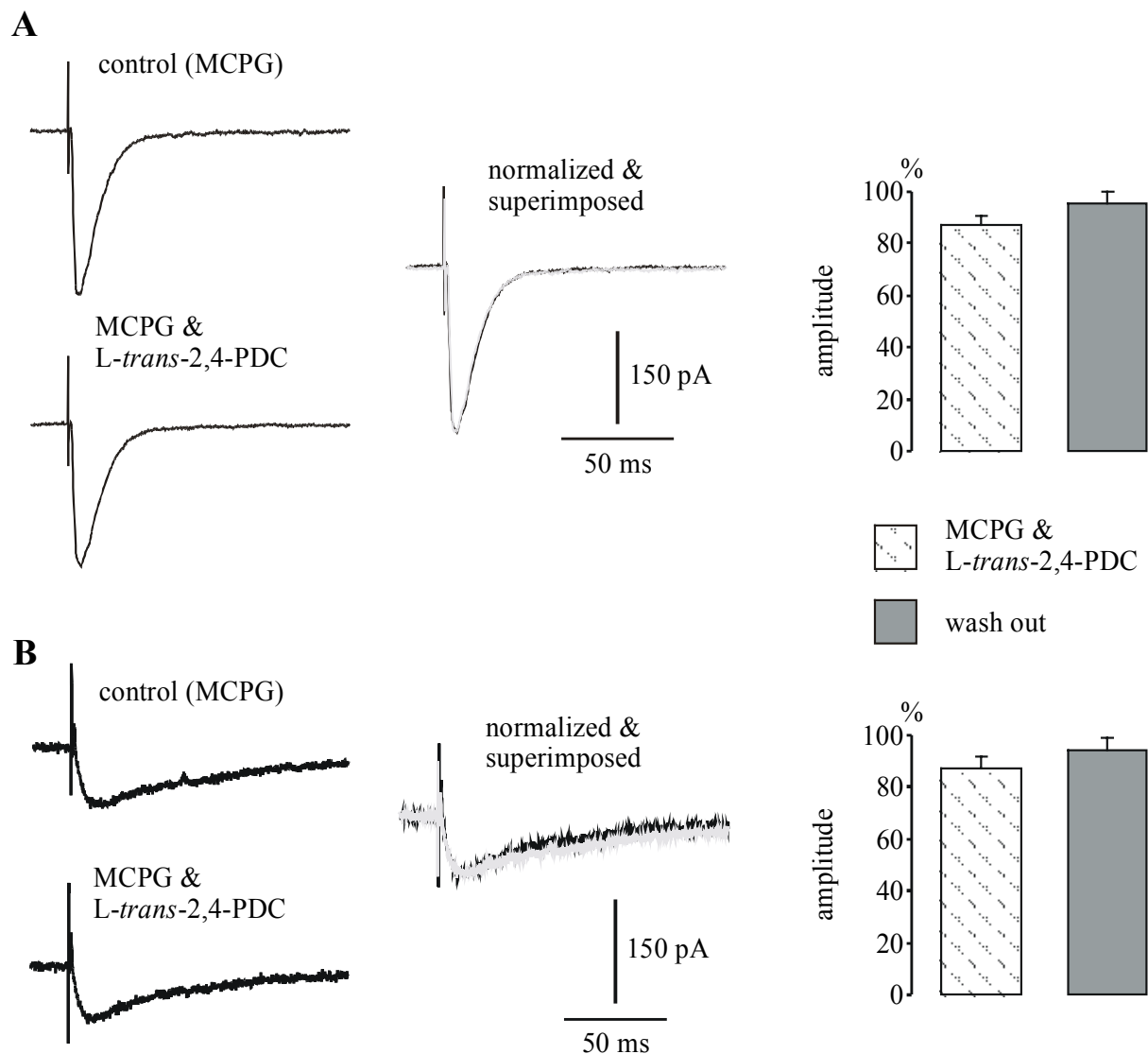


Abbildung 17

Effekt der kombinierten Applikation von MCPG & *L-trans*-2,4-PDC auf die Amplituden der AMPA- (A) und NMDA-EPSCs (B). Es ist zu sehen, daß *L-trans*-2,4-PDC in Gegenwart von MCPG keinen signifikanten Einfluß hatte. Auch in diesem Fall blieb die Kinetik unverändert (rechte Registrierungen, normalisierte Amplituden). In den Balkendiagrammen sind wieder die Amplituden in Prozent gegen die Kontrolle (100%) aufgetragen.

Vergleichbar mit den oben gesehenen Effekten ließen sich auch bei der kombinierten Applikation von MCPG und *L-trans*-2,4-PDC keine Veränderungen der Werte für die Abfallszeitkonstante, die Latenzzeit und die 10-90%-Anstiegszeit der EPSCs ermitteln.

3.2.3 Einfluß des Gruppe I/II mGluR-Agonisten *trans*-(±)-ACPD auf Neurone der Schicht III des medialen entorhinalen Cortex

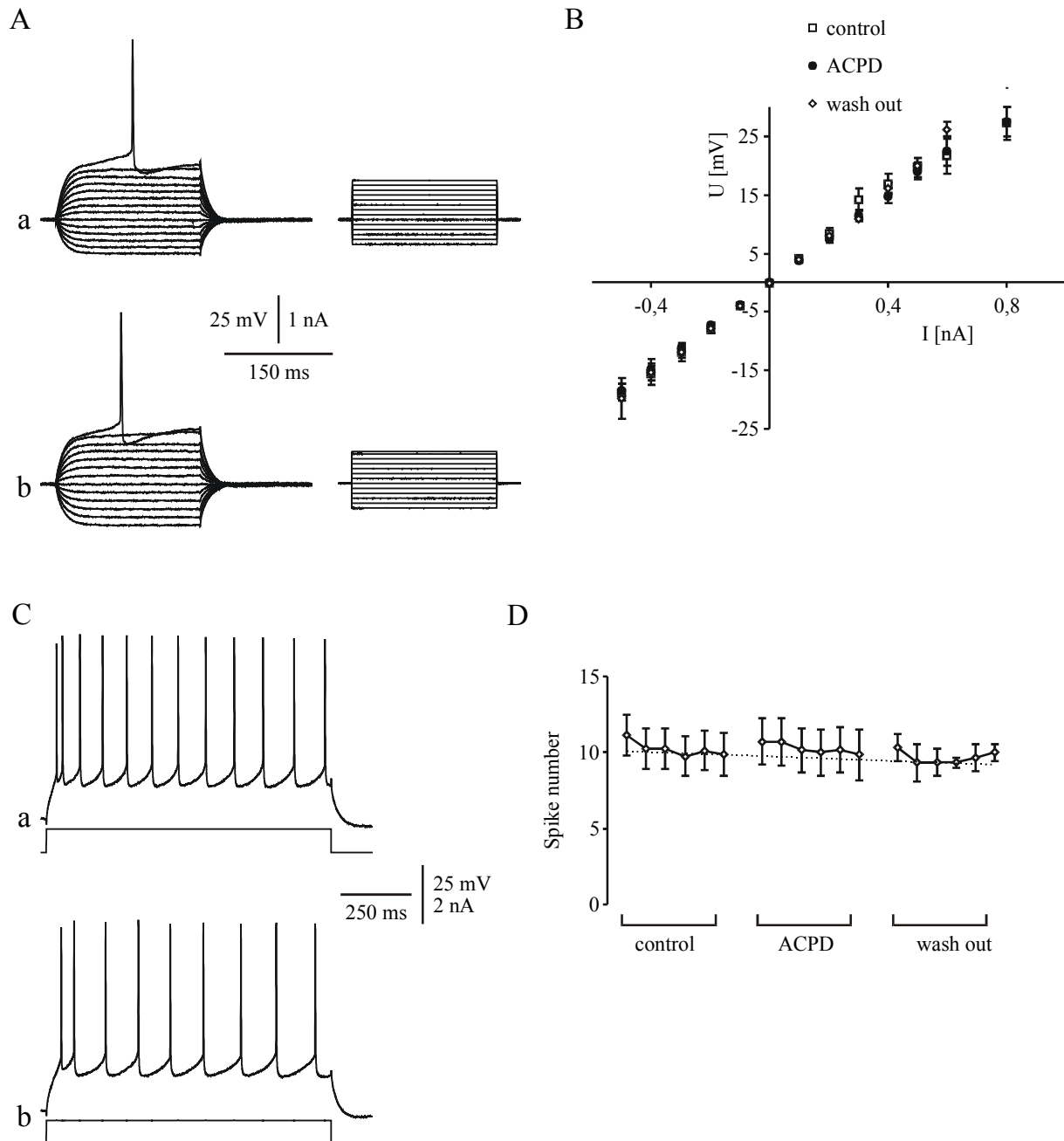
Die Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren führt in verschiedenen Präparationen zu einer Verkleinerung der EPSCs (Baskys & Malenka, 1991; Desai & Conn, 1991; McCaffery *et al.*, 1999). Um zu ermitteln, ob die oben beschriebene Verkleinerung der EPSC-Amplituden durch *L-trans*-2,4-PDC von einer Aktivierung der präsynaptischen glutamatergen Autorezeptoren herrührt, wurde die Wirkung des mGluR-Agonisten *trans*-(±)-ACPD auf die Neurone untersucht.

3.2.3.1 Intrinsische Eigenschaften

Trans-(±)-ACPD (100µM) induzierte während des 20-minütigen Einwaschens über das Bad keinen Einwärtsstrom. In keiner der untersuchten Zellen (n=9) konnte nach Applikation von *trans*-(±)-ACPD ein signifikanter Effekt auf den Eingangswiderstand, die Strom-Spannungskurve oder das Akkomodationsverhalten beobachtet werden. In Abbildung 18 sind die typischen intrinsischen Merkmale anhand einzelner (18 A, C) und mehrerer Zellen (18 B, D) dargestellt. Der Eingangswiderstand verringerte sich geringfügig von $39 \pm 3.61 \text{ M}\Omega$ unter Kontrollbedingungen auf $37.20 \pm 2.44 \text{ M}\Omega$ (Wilcoxon, $p>0.7$). Des weiteren kam es nach Applikation von *trans*-(±)-ACPD zu einer minimalen nicht-signifikanten Verschiebung der Strom-Spannungskurve (Wilcoxon; $p>0.8$). Ebenfalls weitestgehend unbeeinflusst blieb das Akkomodationsverhalten der untersuchten Zellen. Unter *trans*-(±)-ACPD kam es zu einer geringfügigen nicht-signifikanten Erhöhung der Spikefrequenz von $21.16 \pm 2.23 \text{ Hz}$ auf $23.59 \pm 3.46 \text{ Hz}$ ($p>0.1$).

Abbildung 18 (nächste Seite)

Intrinsische Zelleigenschaften nach Applikation von *trans*-(±)-ACPD. In A und B ist zu sehen, daß es keine Veränderungen im Strom-Spannungsverhalten der Zellen gibt. Die Antworten auf hyper- und depolarisierende Strompulse (rechts) sind vor (Aa) und nach der Applikation von *trans*-(±)-ACPD (Ab) nahezu unverändert. In Abbildung B ist dieses Verhalten deutlicher zu erkennen. Dargestellt ist eine gemittelte Strom-Spannungskurve (n=9). In C ist zu erkennen, daß sich auch das Akkomodationsverhalten der Zellen vor (Ca) und nach der Applikation von *trans*-(±)-ACPD (Cb) bei gleicher Strominjektion nicht ändert. Es wurden immer sechs Strominjektionen im Abstand von 15 s gegeben. In (D) ist die gemittelte Anzahl der Aktionspotentiale von neun Zellen unter Kontrolle, *trans*-(±)-ACPD und nach dem Auswaschen der Substanz aufgetragen.



3.2.3.2 Einfluß auf AMPA- und NMDA-vermittelte EPSCs

Trans-(±)-ACPD (100 μ M) reduzierte während des 20-minütigen Einwaschens über das Bad signifikant die Amplituden der AMPA- und der NMDA-vermittelten EPSCs in vergleichbarem Maße wie *L-trans*-2,4-PDC. Ein typisches Beispiel für diese Experimente ist in Abbildung 19 zu sehen. Für die AMPA-EPSCs (Abb. 19A) betrug diese Amplitudenreduktion

39.3 \pm 5.3% und für die NMDA-vermittelten EPSCs (Abb. 19B) lag diese Reduktion bei 36.6 \pm 7.7% (je: n=9; p<0.05). Es gab keinen signifikanten Unterschied in der durch *trans*-(\pm)-ACPD hervorgerufenen Verminderung der EPSC-Amplituden beider Gruppen (p>0.5). Auch beim Einsatz von *trans*-(\pm)-ACPD konnte im Gegensatz zu den Amplituden weder bei den Abfallszeitkonstanten (p>0.1), noch den Latenzzeiten (p>0.7) und den 10-90%-Anstiegszeiten der EPSCs (p>0.7) eine signifikante Änderung festgestellt werden (Abb. 20).

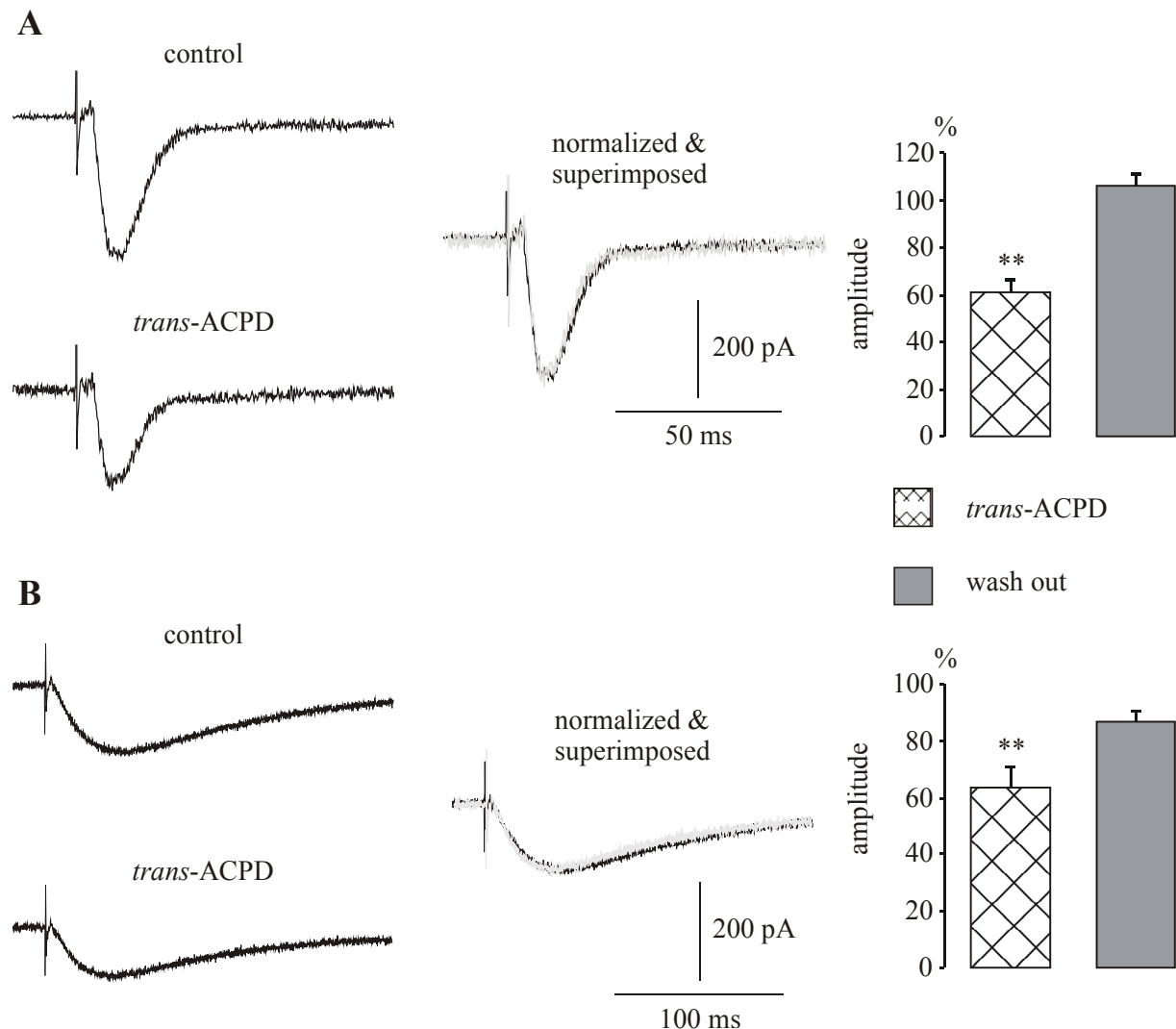


Abbildung 19

Effekt von *trans*-(\pm)-ACPD auf die Amplituden der AMPA- (A) und NMDA-vermittelten (B) EPSCs. Ähnlich wie bei *L-trans*-2,4-PDC werden auch hier die Amplituden der verschiedenen EPSCs um ungefähr den gleichen Wert reduziert. Die normalisierten Amplituden der rechten Registrierungen verdeutlichen die unveränderte Kinetik der synaptischen Ströme. Nebstehend sind die prozentualen Amplitudenveränderungen unter *trans*-(\pm)-ACPD und nach dem Auswaschen gegen die Kontrolle (100%) aufgetragen. *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001

3.2.3.3 Einfluß auf AMPA- und NMDA-EPSCs nach Doppelpuls-Reizung

Die Applikation des Gruppe I/II mGluR-Agonisten *trans*-(±)-ACPD hatte auf den Doppelpuls-Index einen ähnlichen Effekt wie die Applikation von *L-trans*-2,4-PDC. Bei einem Abstand von 50 ms zwischen den Pulsen konnte keine signifikante Veränderung des PPI der AMPA- oder NMDA-EPSCs festgestellt werden. Der PPI der AMPA-EPSCs betrug unter Kontrollbedingungen 1.69 ± 0.28 und unter Applikation von *trans*-(±)-ACPD 1.80 ± 0.34 ($n=7$; $p>0.3$). Für die NMDA-EPSCs hatte der Kontroll-PPI einen Wert von 1.71 ± 0.08 , der sich unter Applikation von *trans*-(±)-ACPD auf 1.90 ± 0.15 ($n=6$; $p>0.2$) veränderte.

3.2.4 Einfluß der kombinierten Applikation von MCPG und *trans*-(±)-ACPD auf Neurone der Schicht III des medialen entorhinalen Cortex

3.2.4.1 Einfluß auf AMPA- und NMDA-vermittelte EPSCs

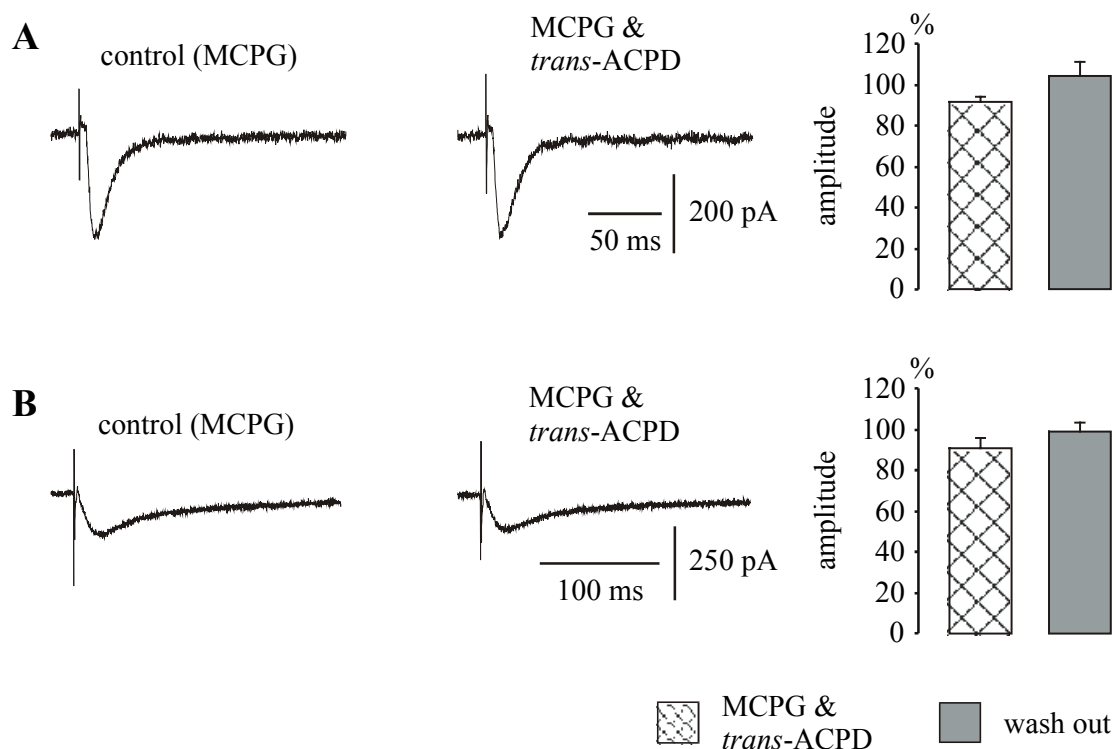


Abbildung 20

Effekt der kombinierten Applikation von MCPG & *trans*-(±)-ACPD auf die Amplituden der AMPA- (A) und NMDA-EPSCs (B). *Trans*-(±)-ACPD war wie *L-trans*-2,4-PDC in Gegenwart von MCPG nicht in der Lage, die Amplituden der EPSCs signifikant zu reduzieren. In den Balkendiagrammen sind wieder die Amplituden in Prozent gegen die Kontrolle (100%) aufgetragen.

Nach dem Vorinkubieren der Hirnschnitte mit 500 μ M MCPG und dem Erhalt stabiler EPSCs konnten die durch *trans*-(\pm)-ACPD induzierten Verkleinerungen der Amplituden der AMPA- und NMDA-EPSCs kaum noch beobachtet werden. In Gegenwart von MCPG kam es nur noch zu einer minimalen Amplitudenreduktion von $8.6 \pm 2.7\%$ für die Amplituden der AMPA-EPSCs ($n=6$; $p>0.08$, Abb. 20A) und von $9.3 \pm 5.4\%$ für die NMDA-vermittelten EPSCs ($n=6$; $p>0.07$; Abb. 20B). Auch bei diesem Teil der Experimente konnte weder bei der Abfallszeitkonstante, der Latenzzeit noch bei der 10-90%-Anstiegszeit eine signifikante Beeinflussung durch *trans*-(\pm)-ACPD festgestellt werden (AMPA, $p>0.1$; NMDA, $p>0.5$).

3.2.5 Kombinierte Applikation von L-*trans*-2,4-PDC und des Gruppe II mGluR-Antagonisten EGLU auf Neurone der Schicht III des mEC

Aktivitätsabhängige Modifikationen der neuronalen Erregbarkeit gelten als der funktionelle Schlüssel-Mechanismus, um die postsynaptische Bewegung der synaptischen Signale zu kontrollieren (Borde *et al.*, 1999; 2000). Untersuchungen konnten zeigen, daß die Aktivierung der mGluRs der Gruppe I zu einer Depolarisation der postsynaptischen Membran, zur Erhöhung des Eingangswiderstandes und zu einer Verminderung der Aktionspotentialadaptation in hippocampalen CA1-Neuronen führt (Cohen *et al.*, 1999; Davies *et al.*, 1995). Ohne Effekt hingegen blieb die Aktivierung der Gruppe II und III mGluRs (Davies *et al.*, 1995).

In den oben beschriebenen Experimenten hatten weder L-*trans*-2,4-PDC noch *trans*-(\pm)-ACPD einen signifikanten Einfluß auf das Membranpotential, den Eingangswiderstand und das Adaptationsverhalten der Zellen. Zusätzlich konnten die beobachteten Amplitudeneffekte durch kombinierte Applikation mit MCPG (Antagonist der Gruppe I/II mGluRs) gehemmt werden. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Untersuchungen der spezifische Gruppe II mGluR-Antagonist EGLU benutzt.

3.2.5.1 Eigeneffekt von EGLU

Da EGLU ebenso wie MCPG als kompetitiver Antagonist an den metabotropen Glutamaterezeptoren wirkt, wurden auch hier die Schnitte mit EGLU (200 μ M) vorinkubiert. Zusätzlich sollten evtl. agonistische Effekte auf die mGluRs ausgeschlossen werden. Nach 20-minütiger Inkubation der Hirnschnitte mit EGLU ließ sich keine signifikante Beeinflussung der intrinsischen Zelleigenschaften feststellen ($n=8$). Der Eingangswiderstand erhöhte sich geringfügig von $38.23 \pm 2.73 \text{ M}\Omega$ auf $42.27 \pm 4.89 \text{ M}\Omega$ ($p>0.9$) und ebensowenig verschob

sich die Strom-Spannungskurve ($p>0.9$). Bezüglich des Adaptationsverhaltens der Zellen läßt sich ebenfalls keine signifikante Beeinflussung feststellen. Die Frequenz erhöhte sich nicht-signifikant von 18.27 ± 0.96 Hz unter Kontrollbedingungen auf 20.80 ± 0.96 Hz nach Applikation von EGLU ($p>0.2$).

Ähnlich geringfügige Änderungen ließen sich anschließend auch bei den gemischten EPSCs feststellen (GABA_A & B blockiert). Nach oben genannter Inkubationszeit ergab sich eine minimale, nicht-signifikante Reduktion der EPSC-Amplituden um $5.09 \pm 2.19\%$ ($n=8$; $p>0.2$). Die restlichen Parameter wiesen ebenfalls keine signifikanten Änderungen auf (Abfallszeitkonstante, $p>0.5$; Latenz, $p>0.2$; 10-90%-Anstiegszeit, $p>0.8$).

3.2.5.2 Einfluß auf die gemischten EPSCs

Nachdem die Hirnschnitte mit EGLU vorinkubiert und stabile Signale aufgenommen wurden, erfolgte die kombinierte Applikation von EGLU und *L-trans*-2,4-PDC. Ein Beispiel für ein typisches Experiment hierzu ist in Abbildung 21 zu sehen. Diese kombinierte Applikation führte letztendlich zu einer nicht-signifikanten Reduktion der EPSC-Amplituden von $6.1 \pm 4.4\%$ ($n=8$; $p>0.3$). Auch in diesem Fall konnten keine signifikanten Veränderungen bei der Abfallszeitkonstante ($p>0.6$), der Latenz ($p>0.3$) und der 10-90%-Anstiegszeit ($p>0.8$) festgestellt werden.

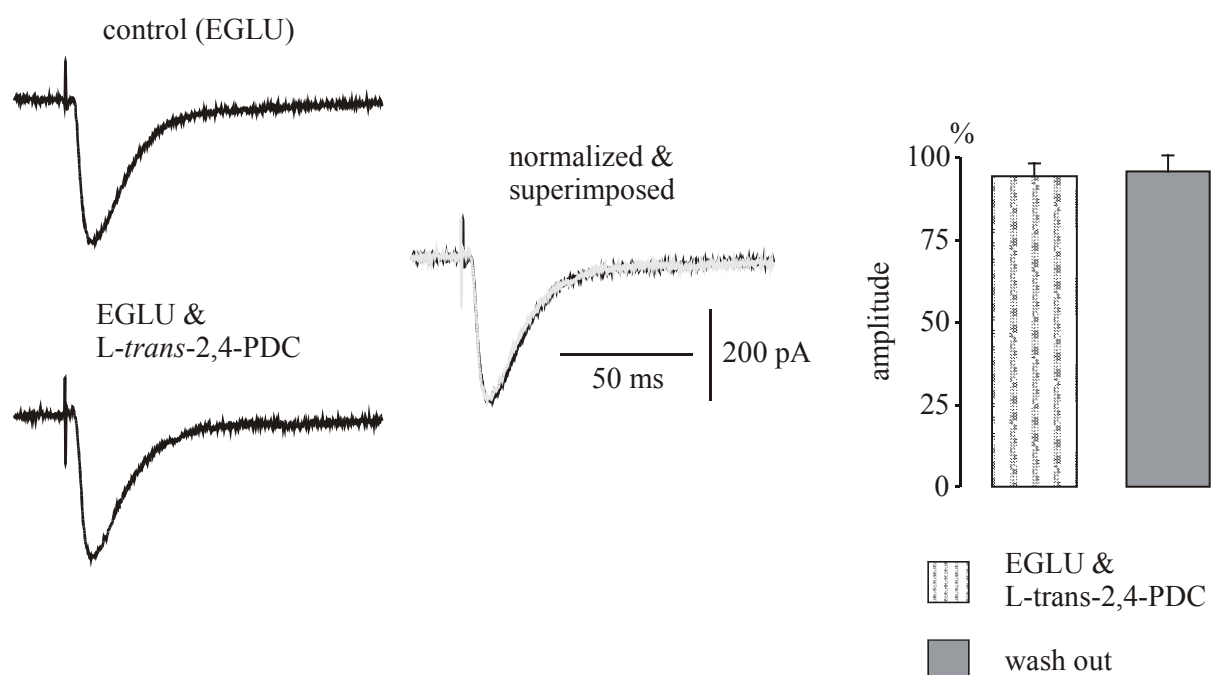


Abbildung 21

Bei der kombinierten Applikation von EGLU und *L-trans*-2,4-PDC konnte kein Effekt auf die Amplituden oder die Kinetik der EPSCs beobachtet werden. Die unveränderte Kinetik ist anhand der rechten Abbildung mit den normalisierten Amplituden zu erkennen.

3.2.6 Einfluß von L-*trans*-2,4-PDC auf spontane exzitatorische Miniaturströme

Um einen genaueren Hinweis darauf zu bekommen, ob L-*trans*-2,4-PDC die hervorgerufenen Effekte prä- oder postsynaptisch vermittelt, wurden mit Hilfe von Frau Dr. Christine Gebhardt abschließend noch Patch-Clamp-Untersuchungen an spontanen exzitatorischen Miniaturströmen (mEPSCs) durchgeführt. Bei diesen Untersuchungen wurde nach Aufnahme der Kontrolldaten für ca. 20 min L-*trans*-2,4-PDC appliziert und dessen Einfluß auf die mEPSCs aufgezeichnet. In keiner der untersuchten neun Zellen zeigte sich eine signifikante Änderung der Amplituden der mEPSCs. Der Mittelwert betrug unter Kontrollbedingungen 12.39 ± 2.03 pA und nach Applikation von L-*trans*-2,4-PDC 12.47 ± 1.92 pA ($p > 0.9$). Ein ähnliches Bild ergibt sich, wenn man die Frequenz der mEPSCs betrachtet. Hier kam es zu einer Verringerung der Frequenz von 1.00 ± 0.33 Hz unter Kontrollbedingungen auf 0.63 ± 0.17 Hz ($p > 0.3$), die aber aufgrund der Streuung nicht signifikant ist.

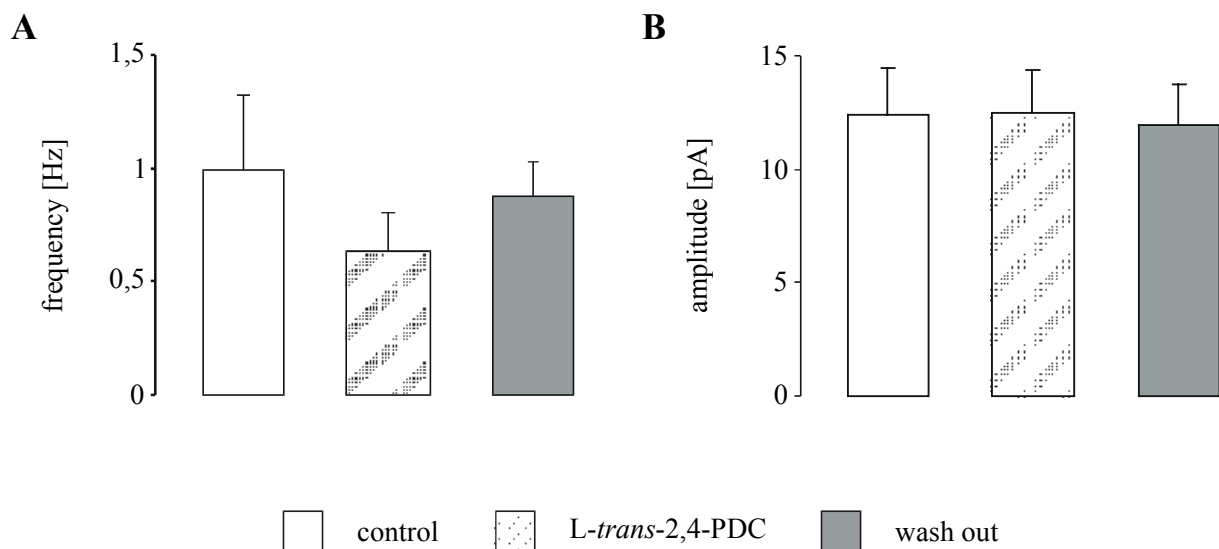


Abbildung 22

Unter L-*trans*-2,4-PDC ließ sich bei Aufzeichnung der mEPSCs nur eine nicht-signifikante Verminderung der Frequenz (A), aber keine Beeinflussung der Amplitude (B) der spontanen Miniaturströme feststellen.

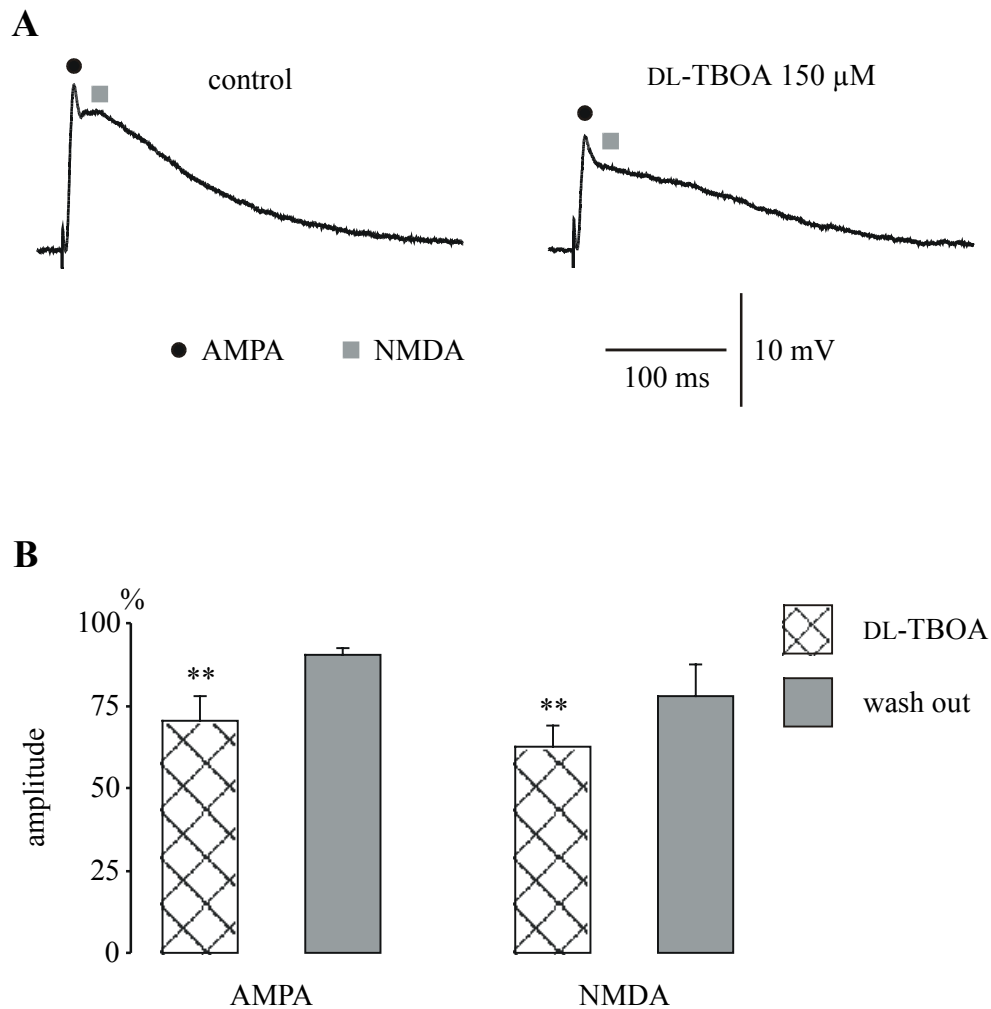
3.2.7 Einfluß von *threo*- β -Benzyloxyaspartat auf gemischte EPSPs

L-trans-2,4-PDC gilt aufgrund seiner, dem Glutamat ähnlichen, Konformation als Substrat und wird dadurch selbst transportiert (Danbolt, 1994; Arriza *et al.*, 1994). Zusätzlich kann eine agonistische Wirkung von *L-trans*-2,4-PDC an metabotropen Glutamatrezeptoren nicht ausgeschlossen werden (Manahan-Vaughan *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1994). Um herauszufinden, ob die durch *L-trans*-2,4-PDC evozierten Effekte wirklich auf der Inhibition der Glutamattransporter beruhen, wurde im Folgenden mit einem zweiten, nicht-kompetitiven Inhibitor gearbeitet. *Threo*- β -Benzyloxyaspartat (DL-TBOA) wurde erst in letzter Zeit synthetisiert (Shimamoto *et al.*, 1998) und ist zur Zeit der stärkste Inhibitor für die Glutamattransporter, der nicht selbst transportiert wird. Auch eine Aktivierung ionotroper und metabotroper Glutamatrezeptoren wurde bislang nicht beobachtet (Shimamoto *et al.*, 1998; 2000).

Die EPSPs für diese Messungen wurden die Zellen in der Stromklemme bei -40 mV gehalten. Bei diesem Membranpotential ist es möglich, die AMPA- und NMDA-vermittelte Komponente (35 ms nach Reizartefakt; [Gloveli *et al.*, 1997c]) zu differenzieren. Ein typisches Experiment ist in Abbildung 23 dargestellt. Für die AMPA-Komponente der EPSPs wurde eine Amplitude von 18.2 ± 1.7 mV an der Spitze des EPSPs und für die NMDA-vermittelte eine Amplitude von 11.2 ± 2.3 mV gemessen. DL-TBOA induzierte in keiner der Messungen eine Änderung des Ruhemembranpotentials. Nach der Applikation von 150 μ M DL-TBOA ließ sich bei den gemischten EPSPs (n=6) eine signifikante Verringerung beider Amplituden beobachten. Dabei wurde die AMPA-Komponente um $30.1 \pm 7.4\%$ ($p < 0.01$) und die NMDA-Komponente um $37.7 \pm 6.4\%$ ($p < 0.01$) verkleinert. In der Amplitudenverkleinerung gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen der AMPA- und der NMDA-Komponente ($p > 0.1$). Die Zeit zum Erreichen des ersten Amplitudenmaximums und die Abfallszeitkonstante wiesen keine signifikanten Änderungen auf ($p > 0.1$ bzw. $p > 0.2$).

Abbildung 23 (nächste Seite)

Gemischte EPSPs vor und nach Applikation von DL-TBOA. Zu sehen sind in (A) die deutlich voneinander unterscheidbare AMPA- (schwarzer Kreis) und NMDA-Komponente (graues Viereck). Dargestellt sind die Mittelwerte von acht Durchläufen pro Originalregistrierung vor (control) und nach dem Einwaschen von 150 μ M DL-TBOA. Im unteren Teil der Abbildung (B) sind die Amplituden der AMPA- und NMDA Komponente prozentual gegen die Kontrollamplitude (amplitude; 100 %) nach der Applikation und nach dem Auswaschen von DL-TBOA aufgetragen.



3.2.7.1 Einfluß von DL-TBOA auf die AMPA-EPSCs nach Einzel- und Doppelpuls-Stimulation

Nachdem die Untersuchungen an den EPSP zeigen konnten, daß es keinen Unterschied in der Amplitudenreduktion zwischen AMPA- und NMDA-EPSPs gibt, wurden für die Voltage-Clamp-Messungen nur noch die AMPA-EPSCs herangezogen.

Nach der Applikation von DL-TBOA (150 μ M) konnte eine signifikante Amplitudenreduktion um $43.1 \pm 6.5\%$ beobachtet werden ($n=7$; $p<0.001$). Im Gegensatz dazu konnte weder bei der Latenzzeit ($p>0.5$), der 10-90%-Anstiegszeit ($p>0.6$) noch der Abfallszeitkonstanten ($p>0.2$) eine signifikante Änderung in Gegenwart von DL-TBOA festgestellt werden.

Für die Doppelpulse wurden erneut Interstimuli-Intervalle von 50 und 100 ms gewählt. Der daraus abgeleitete Doppelpuls-Index erhöhte sich unter Applikation von DL-TBOA und

bei einem Reizabstand von 50 ms signifikant um $22.5 \pm 7.1\%$ ($p < 0.03$). Ein typisches Beispiel dafür ist in Abbildung 24 dargestellt. Diese Erhöhung des PPI war abgeschwächt auch noch bei einem Reizintervall von 100 ms zu beobachten ($p > 0.1$).

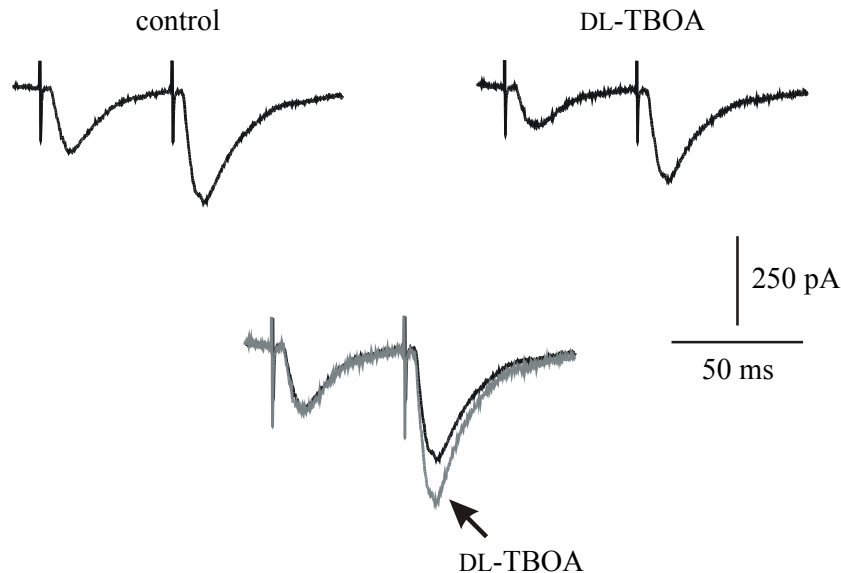


Abbildung 24

DL-TBOA erhöht den PPI isolierter AMPA-vermittelter EPSCs. Im oberen Teil der Abbildung sind die Originalaufnahmen vor (control) und nach dem Einwaschen von 150 μ M DL-TBOA (DL-TBOA) zu sehen. Im unteren Teil wurde die erste Amplitude der DL-TBOA-Aufnahme (grau) auf die Größe der ersten Kontrollamplitude (schwarz) normalisiert, um den Effekt auf die zweite Amplitude und damit den signifikanten Effekt auf den PPI zu verdeutlichen.

3.2.7.2 Kombinierte Applikation von MCPG und DL-TBOA nach Einzel- und Doppelpuls-Stimulation

Ebenso wie bei den Untersuchungen zu *L-trans*-2,4-PDC wurde auch hier vermutet, daß die beobachtete Amplitudenreduktion indirekt durch eine Aktivierung präsynaptischer mGluRs hervorgerufen wird. Deshalb wurde zuerst untersucht, ob DL-TBOA in Gegenwart des Breitband-Antagonisten MCPG weiterhin einen Einfluß auf die Amplituden der AMPA-EPSCs hat.

Nach der Inkubation der Schnitte mit 500 μ M MCPG und dem Erhalt stabiler Signale konnte keine signifikante Amplitudenveränderung unter Applikation von 150 μ M DL-TBOA gesehen werden. Die EPSCs wiesen eine kleine Verringerung der Amplituden um $8.1 \pm 1.6\%$ ($n=6$; $p > 0.1$) und auch die restlichen Parameter blieben statistisch unauffällig.

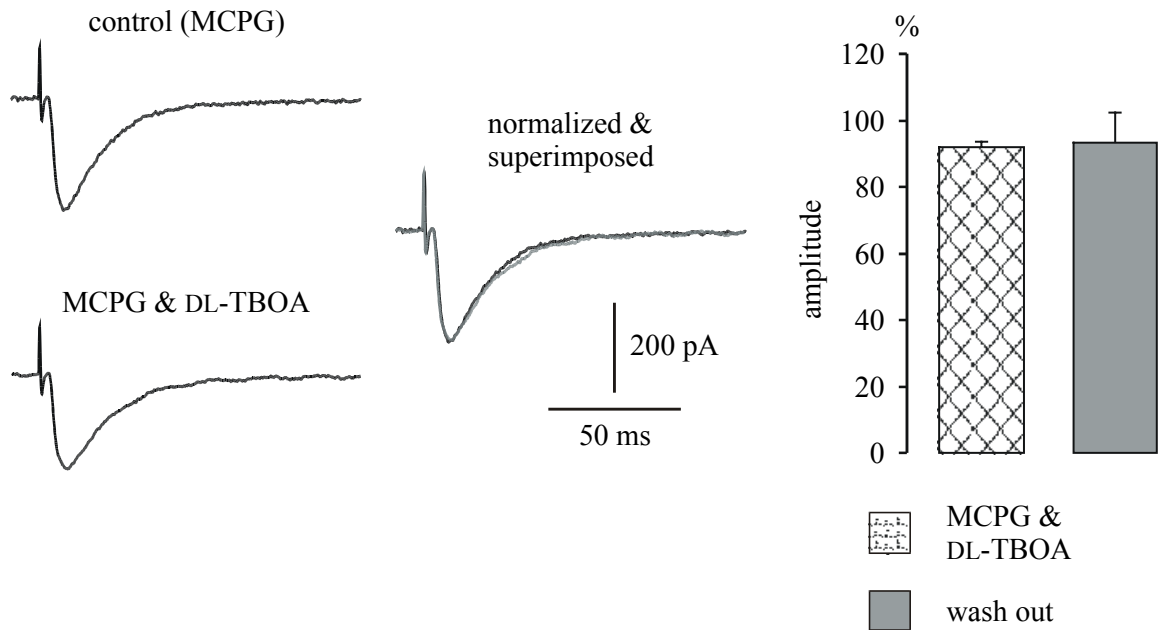


Abbildung 25

Kombinierte Applikation von MCPG und DL-TBOA. In Gegenwart von MCPG hatte DL-TBOA keinen signifikanten Einfluß auf die Amplitude oder die Kinetik der AMPA-EPSCs. Dargestellt sind links die Originalregistrierungen unter Kontrollbedingungen (control) und nach der kombinierten Applikation (MCPG & DL-TBOA). In der rechten Registrierung wurde die Amplitude der kombinierten Applikation auf die Größe der Kontrollamplitude normalisiert, um die unveränderte Kinetik zu veranschaulichen. In dem nebenstehenden Balkendiagramm wurden die Amplituden nach der kombinierten Applikation und nach dem Auswaschen der Substanzen prozentual gegen die Kontrolle (100%) aufgetragen.

Des weiteren konnte bei der kombinierten Applikation von MCPG und DL-TBOA kein signifikanter Einfluß auf den PPI (Reizintervall: 50 ms) festgestellt werden. Der PPI verringerte sich geringfügig von 1.79 ± 0.2 unter Kontrollbedingungen auf 1.71 ± 0.3 nach Applikation von DL-TBOA ($n=6$; $p>0.3$).

3.2.7.3 Kombinierte Applikation von EGLU und DL-TBOA

Da sich der Einfluß von DL-TBOA auf die Amplituden der AMPA-EPSCs durch den Gruppe I/II mGluR-Antagonisten MCPG verhindern ließ, lag es nahe, auch hier die Wirkung von DL-TBOA in Gegenwart des spezifischen Gruppe II mGluR-Antagonisten EGLU zu untersuchen.

Erneut wurden die Hirnschnitte mit 200 μ M EGLU vorinkubiert und nach der Aufnahme stabiler EPSCs erfolgte die Applikation von 150 μ M DL-TBOA. Im Unterschied zu den Untersuchungen mit *L-trans*-2,4-PDC, war DL-TBOA in Gegenwart von EGLU immer noch in der Lage, die AMPA-EPSCs zu reduzieren. Nach 15 Minuten Applikation von DL-TBOA

waren die Amplituden signifikant um $33.4 \pm 6.3\%$ verkleinert ($n=6$; $p<0.02$). Unverändert blieben dagegen die Latenzzeit ($p>0.3$), die 10-90%-Anstiegszeit ($p>0.2$) und die Abfallszeitkonstante ($p>0.8$).

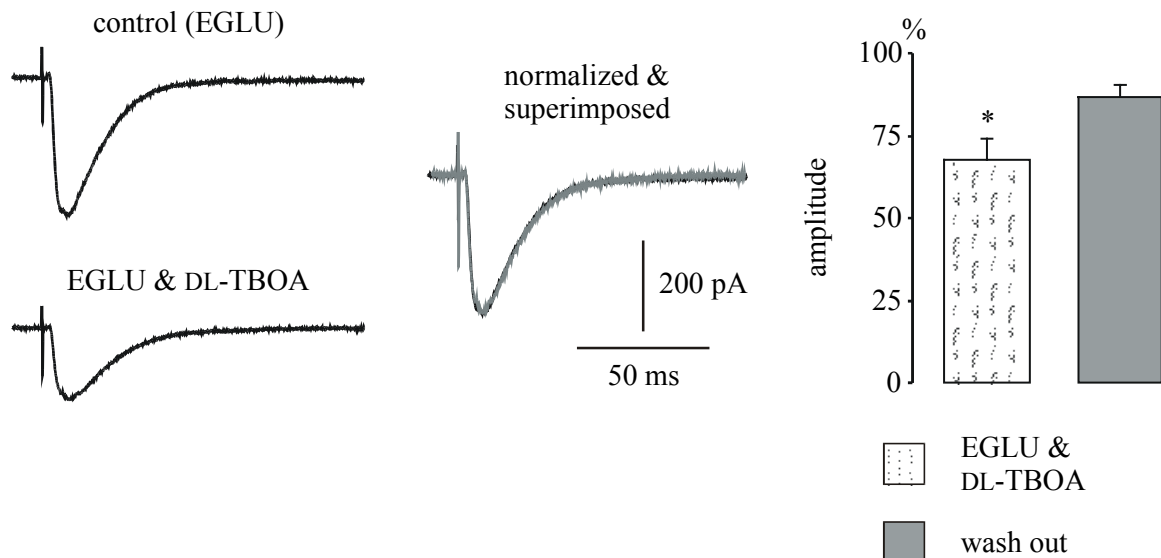


Abbildung 26

Kombinierte Applikation von EGLU und DL-TBOA. Trotz Vorinkubation der Schnitt mit EGLU kam es unter Applikation von DL-TBOA zu einer signifikanten Amplitudenreduktion der AMPA-EPSCs. Dargestellt sind links die Originalregistrierungen unter Kontrollbedingungen (control) und nach der kombinierten Applikation (EGLU & DL-TBOA). In der rechten Registrierung wurde die Amplitude der kombinierten Applikation auf die Größe der Kontrollamplitude normalisiert, um die unveränderte Kinetik zu veranschaulichen. In dem nebenstehenden Balkendiagramm wurden die Amplituden nach der kombinierten Applikation und nach dem Auswaschen der Substanzen prozentual gegen die Kontrolle (100%) aufgetragen. *: $p<0.05$

3.3 Extrazelluläre Messungen an Wildtyp- und EAAC1-knockout-Mäusen

3.3.1 Vergleich der Feldpotentiale der Schichten III und V von Wildtypen und Knock-outs

Bevor an den zur Verfügung stehenden Mäusen pharmakologische Experimente durchgeführt wurden, erfolgte zuerst ein Vergleich der Feldpotentiale. Dabei sollte untersucht werden, ob das Fehlen des Glutamattransporters EAAC1 Unterschiede bezüglich der einzelnen Komponenten der Feldpotentiale hervorrief. Wie schon bei der Ratte führten Stimulationen der oberflächlichen Schichten des lateralen entorhinalen Cortex in den Schichten III und V des mEC bei 70-90 %iger Reizstärke zu komplexen Feldpotentialantworten. Auch bei den Mäu-

sen setzen sich diese aus folgenden Komponenten zusammen: einem kurzen frühen negativen Potential, das von einem positiven und einem späten langen negativen Potential gefolgt wird. Es ließ sich feststellen, daß es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Feldpotentialen der Wildtypen und EAAC1-Mäuse gab. Typische Feldpotentiale der Schichten III und V der Mäuse sind in Abbildung 27 dargestellt. In der Schicht III erreichte die erste negative Komponente ihr Maximum nach ca. 5 ms und hatte beim Wildtypen (n=13) eine Amplitude von -1.31 ± 0.18 mV und bei den EAAC1-Tieren (n=8) von -1.24 ± 0.22 mV ($p>0.8$). Die Amplitude der positiven Komponente betrug beim Wildtypen 0.19 ± 0.07 mV und 0.19 ± 0.04 mV bei den EAAC1-Knockouts ($p>0.9$) und ihr Maximum wurde nach ca. 12 ms erreicht. Die Amplitudenmaxima der zweiten negativen Komponente lagen bei ca. 40 ms und hatten bei den Wildtypen eine Größe von -0.17 ± 0.03 mV und bei den EAAC1-Mäusen von -0.16 ± 0.03 mV ($p>0.6$). Ein ähnliches Bild bot sich bei den Feldpotentialen der Schicht V. Die Zeit zum Erreichen der jeweiligen Amplitudenmaxima ist gleich denen der Schicht III. Bei den Wildtypen hatte das erste negative Potential eine Amplitude von -1.09 ± 0.26 mV und bei den EAAC1-Knockouts von -0.95 ± 0.22 mV ($p>0.5$), während die zweite negative Komponente der Wildtypen eine Größe von -0.15 ± 0.05 mV und die der EAAC1-Tiere -0.12 ± 0.03 mV ($p>0.8$) hatten. Das Amplitudenmaximum der positiven Komponente lag für die Wildtypen bei 0.19 ± 0.09 mV und für die Knockouts bei 0.11 ± 0.22 ($p>0.5$).

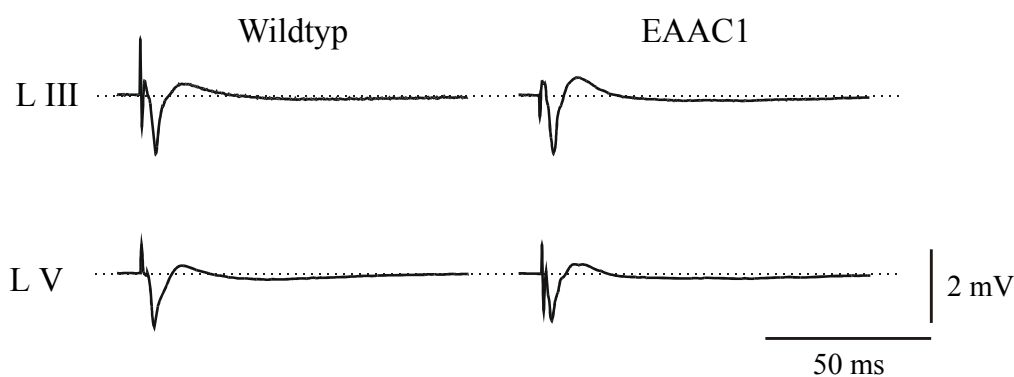


Abbildung 27

Feldpotentiale von Wildtyp- und EAAC1-knockout-Mäusen. Im oberen Teil der Abbildung sind typische Feldpotentiale der Schicht III des mEC und im unteren Teil die Feldpotentiale der Schicht V für den jeweiligen Maustyp.

3.3.2 Einfluß von L-trans-2,4-PDC auf die Feldpotentiale der Schicht III

Ähnlich wie bei der Ratte, hatte die Applikation von L-trans-2,4-PDC (400 μ M, 15 min) bei der Wildtyp-Maus (n=7) eine signifikante Reduktion sämtlicher Komponenten der Feldpotentiale der Schicht III des mEC zur Folge (Abb. 28). Die Latenzzeiten zu den jeweiligen Amplitudenmaxima blieben dabei unverändert. Die erste negative Komponente war nach dem Einwaschen von L-trans-2,4-PDC gegenüber der Kontrolle um 27.7 ± 9.4 % verkleinert ($p < 0.04$) und die zweite negative verringerte sich um 23.3 ± 8.4 % ($p < 0.04$). Die dazwischen liegende positive Komponente verkleinerte sich ebenfalls signifikant um 40.5 ± 12.7 % ($p < 0.03$). Alle untersuchten Komponenten waren reversibel.

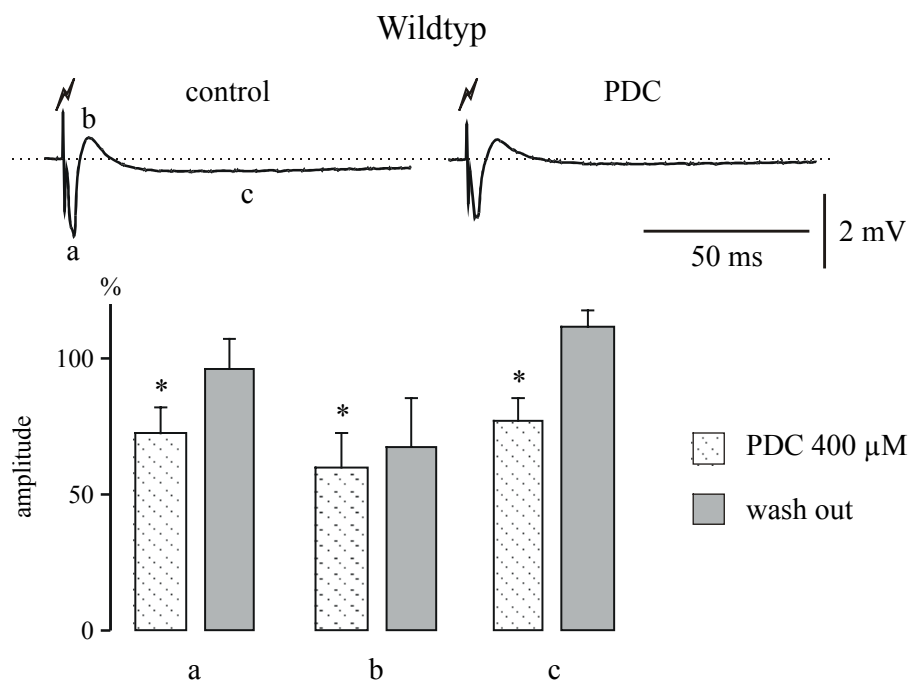


Abbildung 28

Einfluß von L-trans-2,4-PDC auf die Feldpotentiale der Schicht III des Wildtypen. Typische Feldpotentialantworten der Schicht III bei maximaler Stimulation vor (control) und nach der Applikation von 400 μ M L-trans-2,4-PDC (PDC). Die kleinen Buchstaben an den Kontrollantworten zeigen die verschiedenen Komponenten der Feldpotentiale: a, erste negative Komponente; b, positive Komponente; c, zweite negative Komponente. Im unteren Teil der Abbildung sind der Effekt von L-trans-2,4-PDC auf die einzelnen Komponenten und das Auswaschen prozentual gegen die Kontrollwerte (100 %) aufgetragen. Die eingetragenen Balken beziehen sich auf die für den jeweiligen Versuch gültigen Kontrollversuche, ebenso die statistischen Vergleiche. *: $p < 0.05$

Ein etwas anderes Bild bietet sich, wenn man den Effekt von L-trans-2,4-PDC auf die Feldpotentiale der Knockout-Mäuse (n=8) betrachtet (Abb. 29). Wiederum blieben die Latenzzeiten unverändert. Im Gegensatz zu den Wildtypen vergrößerte sich jedoch die erste negative Komponente signifikant um 9.3 ± 1.9 ($p < 0.01$). Dieser Effekt war nach 60-minütigem

Auswaschen von *L-trans*-2,4-PDC sogar noch verstärkt ($19.2 \pm 4.7 \%$, $p < 0.01$). Die positive und die zweite negative Komponente hingegen wurden unter Applikation von *L-trans*-2,4-PDC signifikant verkleinert. Diese Amplitudenreduktion betrug bei der positiven Komponente $24.8 \pm 3.0 \%$ ($p < 0.001$) und bei der späten negativen $11.8 \pm 3.9 \%$ ($p < 0.05$). In Kontrast zu der ersten positiven Komponente waren diese letzten beiden Komponenten reversibel.

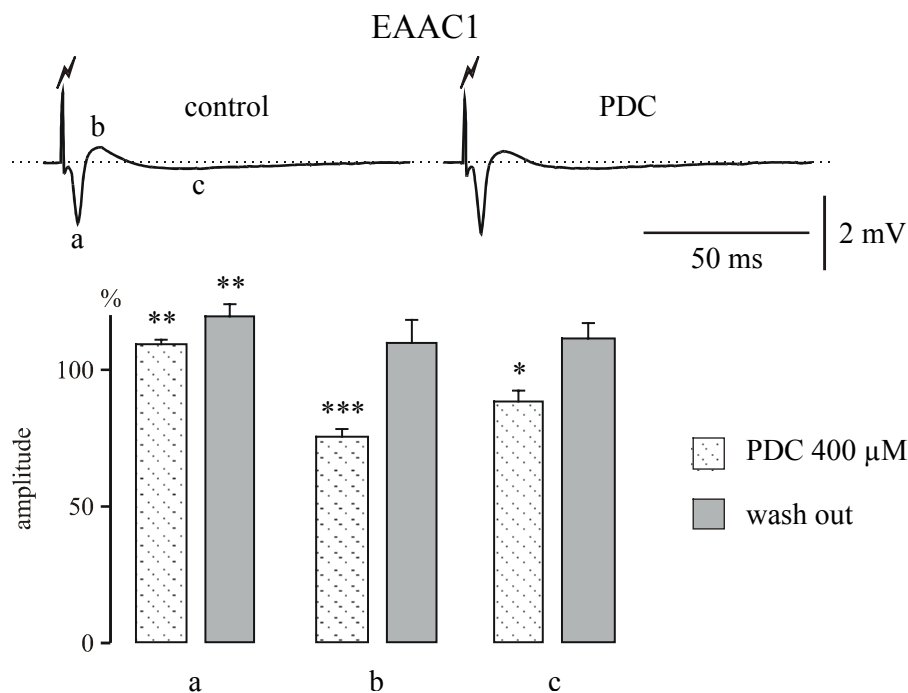


Abbildung 29

Einfluß von *L-trans*-2,4-PDC auf die Feldpotentiale der Schicht III der EAAC1-knockout-Maus. Im oberen Teil der Abbildung sind charakteristische Feldpotentialantworten der Schicht III bei maximaler Stimulation vor (control) und nach der Applikation von $400 \mu\text{M}$ *L-trans*-2,4-PDC (PDC) zu sehen. Die kleinen Buchstaben an den Kontrollantworten zeigen die verschiedenen Komponenten der Feldpotentiale: a, erste negative Komponente; b, positive Komponente; c, zweite negative Komponente. Im darunter befindlichen Balkendiagramm sind der Effekt von *L-trans*-2,4-PDC auf die einzelnen Komponenten und das Auswaschen prozentual gegen die Kontrollwerte (100 %) aufgetragen. Die eingetragenen Balken beziehen sich auf die für den jeweiligen Versuch gültigen Kontrollversuche, ebenso die statistischen Vergleiche. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

Beim Vergleich zwischen Wildtyp- und EAAC1-Mäusen bzgl. der Wirkung von *L-trans*-2,4-PDC konnten weder bei der positiven Komponente ($p > 0.6$) noch der zweiten negativen Komponente ($p > 0.5$) signifikante Unterschiede beobachtet werden. Lediglich die erste negative Komponente der Feldpotentiale wies einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp-Maus (Amplitudenreduktion) und EAAC-Knockout (Amplitudensteigerung) auf ($p < 0.04$).

3.3.3 Einfluß von DL-TBOA auf die Feldpotentiale der Schichten III und V des mEC von Wildtyp- und Knockout-Mäusen

Unabhängig von Wildtyp- oder Knockout-Mäusen hatte die Applikation von 150 μ M DL-TBOA (20 min) eine signifikante Reduktion aller Amplituden der Schichten III und V zur Folge. Die Latenzzeiten blieben hingegen unverändert. Bei den Wildtypen (n=7) wurden in der Schicht III (Abb. 30) die Amplituden der ersten und zweiten negativen Komponente um 47.2 ± 6.1 % ($p < 0.001$) bzw. 42.8 ± 12.6 % ($p < 0.02$) reduziert. Die positive Komponente wies eine Verminderung um 70.0 ± 18.0 % ($p < 0.01$) auf. In der Schicht V (Abb. 30) hatte die Amplitudenreduktion der ersten und zweiten negativen Komponente einen Wert von 43.2 ± 8.4 % ($p < 0.001$) bzw. 24.7 ± 4.4 % ($p < 0.01$). Die Reduktion der positiven Komponente betrug 37.8 ± 3.8 % ($p < 0.001$). Die Effekte auf die einzelnen Komponenten waren reversibel.

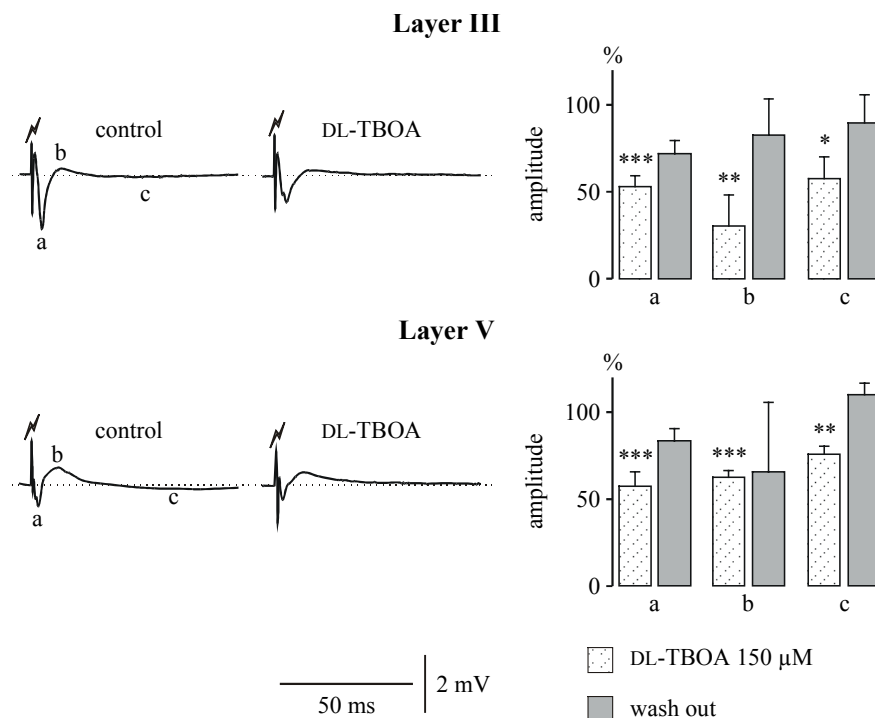


Abbildung 30

Maximale Feldpotentialantworten der Schichten III (Layer III) und V (Layer V) bei Wildtypen vor und nach der Applikation von 150 μ M DL-TBOA. Die kleinen Buchstaben an den Kontrollantworten zeigen die verschiedenen Komponenten der Feldpotentiale: a und c, 1. und 2. negative Komponente; b, positive Komponente. In den nebenstehenden Balkendiagrammen sind der Effekt von DL-TBOA auf die einzelnen Komponenten und das Auswaschen gegen die Kontrollwerte (100 %) prozentual aufgetragen. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

Bei den Knockout-Tieren (n=6) verringerte DL-TBOA in der Schicht III die Amplitude der ersten negativen Komponente um 59.5 ± 9.4 % ($p < 0.01$) und die der zweiten negativen um 73.1 ± 8.4 % ($p < 0.01$). Die dazwischen liegende positive Komponente wurde um $57.4 \pm$

12.8 % ($p < 0.02$) reduziert. In der Schicht V lag die Verkleinerung der Amplituden der ersten und zweiten negativen Komponente bei 30.6 ± 2.7 % ($p < 0.001$) bzw. bei 40.5 ± 7.5 % ($p < 0.01$). Die Amplitude der positiven Komponente wurde um 57.9 ± 16.0 % ($p < 0.02$) reduziert. Auch hier waren die beschriebenen Effekte reversibel.

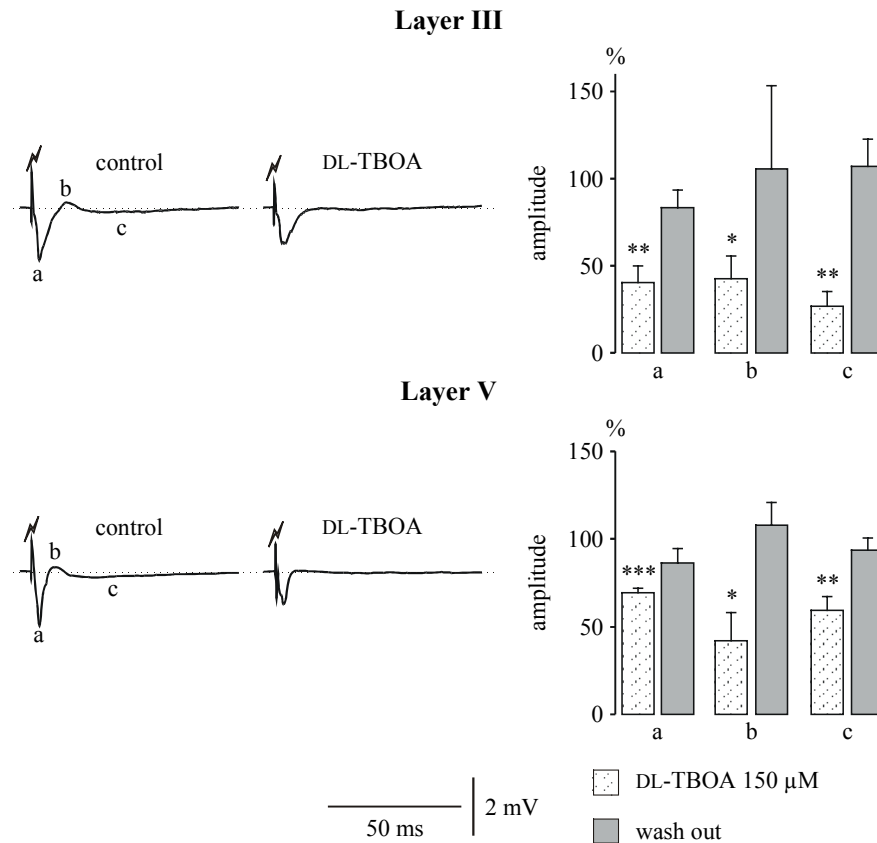


Abbildung 31

Maximale Feldpotentialantworten der Schichten III (Layer III) und V (Layer V) bei EAAC1-knockout-Mäusen vor und nach der Applikation von 150 μ M DL-TBOA. Die kleinen Buchstaben an den Kontrollantworten zeigen die verschiedenen Komponenten der Feldpotentiale: a und c, 1. und 2. negative Komponente; b, positive Komponente. In den nebenstehenden Balkendiagrammen sind der Effekt von DL-TBOA auf die einzelnen Komponenten und das Auswaschen gegen die Kontrollwerte (100 %) prozentual aufgetragen. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

Beim Vergleich zwischen Wildtypen und Knockout-Mäusen bzgl. der Wirkung von DL-TBOA auf die einzelnen Komponenten der Feldpotentiale konnten in keiner der beiden Schichten signifikante Unterschiede festgestellt werden (1. negative Komponente: $p > 0.8$, beide Schichten; positive Komponente: $p > 0.7$, beide Schichten; 2. negative Komponente: $p > 0.2$, beide Schichten).

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß alle benutzten Transport-Inhibitoren sowohl die glutamaterge Komponente der Feldpotentiale als auch die exzitatorischen postsynaptischen Potentiale/Ströme reduzieren. Ein entgegengesetzter Effekt wurde nur bei den EAAC1-knockout-Mäusen unter Applikation des kompetitiven *L-trans*-2,4-PDC beobachtet. Dabei ließen sich in den pharmakologischen Untersuchungen Unterschiede feststellen, die vor allem darauf beruhen, daß in dieser Arbeit kompetitive (*L-trans*-2,4-PDC) und nicht-kompetitive (DHK, DL-TBOA) benutzt wurden.

Im Vergleich zu Untersuchungen an Zellkulturen (z.B. Maki *et al.*, 1994) sind die meisten in dieser Arbeit benutzten Konzentrationen der Substanzen relativ hoch. Frühere Studien aus unserem Labor ergaben jedoch, daß die Equilibration der Substanzen an Hirnschnitten in einer Interface-Kammer sehr lange dauert, so daß nach 30 min erst ca. 30 % des Pharmakons im Hirnschnitt erwartet werden können (Müller *et al.*, 1988). Bei kompetitiven Substanzen kann die Equilibrierungszeit sogar noch wesentlich höher sein. So kann *L-trans*-2,4-PDC selbst effektiv in Gliazellen und Neurone aufgenommen werden (Pannicke *et al.*, 1994). Ähnliche Unterschiede konnten in *in vitro* Studien mit Muscimol und GABA (Aprison & Lipkowitz, 1989) sowie bei Vergleichen von Glutamateffekten mit der Wirkung von AMPA, Kainat und NMDA gefunden werden (Iwama *et al.*, 1991). In jeder dieser Studien mußte der transportierte Agonist in wesentlich höherer Konzentration appliziert werden als der nicht-transportierte.

4.1 Wirkung der Glutamat-Transport-Inhibitoren auf die Feldpotentiale der Ratte

Anhand der Feldpotentiale der Schichten III und V des medialen entorhinalen Cortex konnte gezeigt werden, daß die unspezifischen Glutamat-Transport-Inhibitoren Dihydrokainat (DHK) und *L-trans*-2,4-PDC in der Lage sind, die negativen Komponenten der stimulus-evozierten Feldpotentiale signifikant zu vermindern. Dabei konnte eine Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes beobachtet werden. So wurde bei dem eigentlich stärkeren Blocker *L-trans*-2,4-PDC kein Effekt bei einer Konzentration von 200 µM beobachtet. Die Depression der negativen Feldpotentialkomponenten wies keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der beiden Schichten auf, was darauf schließen läßt, daß die Glutamatregulation in beiden Schichten ähnlich ist.

Bezüglich der positiven Komponente der Feldpotentiale ließen sich unterschiedliche, konzentrationsabhängige Effekte beim Einsatz beider Inhibitoren beobachten. So konnte unter Applikation von 200 μM DHK in der Schicht III des mEC eine signifikante Vergrößerung der Amplitude gesehen werden, die, wenn auch nicht signifikant, ebenfalls in der Schicht V des mEC vorhanden war, während es bei Applikation der höheren Konzentration von 400 μM zu einer nicht-signifikanten Unterdrückung dieser Komponente in beiden Schichten kam. Im Gegensatz dazu war nach Applikation von *L-trans*-2,4-PDC in einer Konzentration von 200 μM kein Effekt bzw. eine geringfügige Amplitudenreduktion der positiven Komponente beider Schichten erkennbar. Diese Reduktion ließ sich durch Applikation der höheren Konzentration auf ein signifikantes Maß verstärken und trat wiederum in beiden Schichten auf.

Die zellulären Mechanismen hinter diesen komplexen Feldpotentialantworten sind noch nicht zweifelsfrei geklärt. So konnte unter Applikation von 1 μM MK-801, eines nicht-kompetitiven Antagonisten der NMDA-Rezeptoren, kein signifikanter Effekt auf alle drei Komponenten der Feldpotentiale des mEC gesehen werden (Gloveli *et al.*, 1997b), was darauf schließen läßt, daß NMDA-Rezeptoren nur einen geringen Anteil an den evozierten Feldpotentialen haben. Die Applikation von CNQX oder NBQX hingegen führte zu einer Unterdrückung dieser Komponenten (Schmitz *et al.*, 1999; Stenkamp *et al.*, 1998) und läßt schlußfolgern, daß es sich vor allem bei der ersten negativen Komponente der Feldpotentiale vorrangig um AMPA-vermittelte Potentiale handelt.

Die Effekte von DHK und *L-trans*-2,4-PDC auf die evozierten Feldpotentiale könnten sich durch Desensitisierung postsynaptischer Glutamatrezeptoren (iGluRs) aufgrund der angestiegenen extrazellulären Glutamatkonzentration erklären lassen. Wichtig hinsichtlich einer genaueren Aussage ist die Tatsache, daß DHK nicht nur die Na^+ -abhängigen Glutamattransporter inhibiert, sondern auch postsynaptische Glutamatrezeptoren vor allem vom AMPA/KA-Typ (Kidd & Isaac, 2000) aktivieren kann, während *L-trans*-2,4-PDC keinen oder nur einen geringen Effekt auf diese Rezeptoren hat (Maki *et al.*, 1994). Dafür wirkt *L-trans*-2,4-PDC aber aufgrund seiner, dem Glutamat ähnlichen, Konformation als Substrat und wird somit selbst transportiert (Danbolt, 1994). Es ist möglich, daß DHK teilweise die AMPA/KA-Rezeptoren desensitisiert und dies dann zur Reduktion der ersten negativen Komponente der Feldpotentiale führt. Eine weitere Möglichkeit der Desensitisierung postsynaptischer GluRs ergibt sich aus der erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentration nach Inhibition der Transporter. Der Zeitverlauf der Desensitisierung ist allerdings für AMPA- und NMDA-Rezeptoren unterschiedlich. Für eine Desensitisierung postsynaptischer Rezeptoren würde hier sprechen, daß die negativen Komponenten der Feldpotentiale beider Schichten in ähnlicher Weise durch

die benutzten Transport-Inhibitoren beeinflusst wurden. Gegen eine Desensitisierung spricht, daß keine Unterschiede in den Zeitverläufen der Feldpotentiale beobachtbar waren.

Um die Wirkung der beiden Transport-Inhibitoren auf die negativen Komponenten der Feldpotentiale zu erklären, gibt es aber auch noch eine zweite Möglichkeit. Dabei könnten die angestiegene extrazelluläre Glutamatkonzentration und/oder die Transport-Inhibitoren indirekt präsynaptische metabotrope Glutamatrezeptoren (Maki *et al.*, 1994) aktivieren, dadurch die Freisetzung von Glutamat reduzieren und somit den negativen Effekt auf die Amplituden vermitteln.

Hinsichtlich der verschiedenen Effekte auf die positive Komponente der Feldpotentiale beider Schichten in Abhängigkeit von der benutzten Substanz und deren Konzentration läßt sich keine genaue Aussage treffen, da nicht bekannt ist, in welchem Ausmaß GABA-vermittelte inhibitorische postsynaptische Potentiale und GluRs zu diesem Teil der evozierten Potentiale beitragen.

Als Grundlage für diese Arbeit wurde von der Hypothese ausgegangen, daß die beobachteten Effekte auf die indirekte Wirkung an präsynaptischen mGluRs und/oder Kainatrezeptoren zurückzuführen sind, denen es möglich ist, die präsynaptische Transmitterfreisetzung zu modulieren. In verschiedenen Studien konnte inzwischen eine Potenzierung der synaptischen Glutamatfreisetzung beschrieben werden, die durch Gruppe I mGluRs vermittelt wurde (Moroni *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 1999). Im Hippocampus vermittelt die Aktivierung präsynaptischer mGluRs der Gruppe I eine Hemmung der glutamatergen Transmission (Gereau & Conn, 1995a; Manzoni & Bockaert, 1995). Ebenfalls ein stark vermindender Einfluß der glutamatergen Transmission wurde nach Aktivierung von mGluRs der Gruppen II und III gezeigt (Übersichtsartikel: Anwyl, 1999). Für präsynaptische Kainatrezeptoren konnte gezeigt werden, daß sie in niedriger Konzentration die präsynaptische Glutamatfreisetzung erhöhen und in hoher Konzentration herabsetzen (Chittajallu *et al.*, 1996; Perkinton & Sihra, 1999). Vermutlich spielt dieser letzte Rezeptortyp für unsere Untersuchungen keine weitere Rolle, da die Blockade dieser Rezeptoren in den Voltage-Clamp-Experimenten keinen Einfluß auf die beobachtete Hemmung der exzitatorischen synaptischen Transmission hatte.

4.2.1 Einfluß auf intrinsische Zelleigenschaften

Bei diesen Untersuchungen war für mich vor allem das Akkomodationsverhalten der Zellen unter Kontrollbedingungen und nach Applikation der verschiedenen Substanzen interessant, da vor allem das Akkomodationsverhalten sehr sensitiv gegenüber Änderungen der postsynaptischen Erregung ist (Charpak *et al.*, 1990; Cohen *et al.*, 1999).

Dem Akkomodationsverhalten hippocampaler und anderer kortikaler Neurone liegt der Ca^{2+} -aktivierte K^{+} -Strom I_{AHP} zugrunde, der auch für die langsame Nachhyperpolarisation (AHP) verantwortlich ist (Übersichtsartikel: Anwyl, 1999; Pedarzani & Storm, 1996a). Durch monoamine Transmitter wie Noradrenalin, Dopamin, Serotonin und Histamin kann dieser Strom über die Aktivierung von cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) und der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) unterdrückt werden (Pedarzani & Storm, 1996a). Zusätzlich zu diesen Transmittern kann I_{AHP} in hippocampalen Neuronen auch über muskarinische Rezeptoren durch Azetylcholin und über mGluRs durch Glutamat moduliert werden (Pedarzani & Storm, 1996a). Dabei ist noch nicht zweifelsfrei geklärt über welchen intrazellulären Weg die Wirkung dieser letzten beiden vermittelt wird - aber es scheint nicht der cAMP-PKA-Weg zu sein (Gerber *et al.*, 1992; Sim *et al.*, 1992).

Es konnte in einigen Studien gezeigt werden, daß eine Aktivierung der mGluRs den I_{AHP} blockiert und dabei die Akkomodation der Aktionspotentialgenerierung vermindert. Zu den untersuchten Zellen gehören dabei unter anderem CA1-Pyramidenzellen, Zellen der CA3-Region, des Gyrus dentatus und des basolateralen Kerns der Amygdala (Übersichtsartikel: Anwyl, 1999). Dabei scheint die Gruppe I der mGluRs bei der Blockade des I_{AHP} -Stromes eine entscheidende Rolle zu spielen, da in Untersuchungen mit den verschiedenen Agonisten dieser Gruppe (DHPG, (1S,3R)-ACPD) gezeigt wurde, daß diese den Strom am stärksten inhibieren, während Agonisten der Gruppe II und III mGluRs keinen Einfluß hatten (Gereau & Conn, 1995a). Untersuchungen im Gyrus dentatus der Ratte konnten erste Hinweise darauf geben, daß die Aktivierung der mGluRs die IP₃-Produktion und nachfolgend die Mobilisierung intrazellulären Kalziums anregt. Danach kommt es zu einer erhöhten Phosphorylierung von Tyrosin und letztendlich zur Blockade des I_{AHP} -Stromes (Abdul-Ghani *et al.*, 1996). Wie einige Studien belegen, scheint die Blockade des I_{AHP} dabei nur indirekt von der Aktivierung der Proteinkinase C abzuhängen (z.B. Abdul-Ghani *et al.*, 1996; Nouranifar *et al.*, 1998; Pedarzani & Storm, 1996b; Shirasaki *et al.*, 1994). Vermutlich kommt es über die Aktivierung der mGluRs in der CA1 zur Hemmung des Adenylatcyclaseweges durch PKC. Dadurch sind

β -adrenerge Rezeptoren, die an die Adenylatcyclase gekoppelt sind, nicht mehr in der Lage, den I_{AHP} -Strom zu blockieren (Nouranifar *et al.*, 1998; Pedarzani & Storm, 1996b).

In den hier vorliegenden Untersuchungen konnte bei keiner der benutzten Substanzen eine signifikante Änderung der untersuchten intrinsischen Eigenschaften (Eingangswiderstand, Strom-Spannungskurve) festgestellt werden und das unveränderte Akkomodationsverhalten läßt darauf schließen, daß hier keine Blockade des I_{AHP} durch die Aktivierung metabotroper Glutamatrezeptoren vorliegt.

4.2.2 Einfluß auf die synaptische Erregung im mEC der Ratte

Die im Ergebnisteil präsentierten Daten zeigen, daß eine Inhibition der Glutamattransporter im entorhinalen Cortex vor allem in einer Reduktion der Amplituden der evozierten exzitatorischen postsynaptischen Ströme resultiert, ohne daß deren Dauer beeinflußt wird. Die EPSCs der Projektionszellen der Schicht III des mEC setzen sich aus verschiedenen Komponenten zusammen: die über AMPA/Kainat-Rezeptoren vermittelten Antworten sind für die schnelle synaptische Transmission verantwortlich, während die NMDA-Rezeptoren zur langsamen Komponente beitragen (Gloveli *et al.*, 1997c). Daher war es interessant herauszufinden, ob es Unterschiede in der beobachteten Amplitudenreduktion der EPSCs in Abhängigkeit von dem vermittelnden Rezeptor (AMPA-, Kainat- oder NMDA-Rezeptor) gab. Dabei sollte noch erwähnt werden, daß es sich bei der verbleibenden, depolarisierenden Antwort mit großer Sicherheit um eine NMDA-vermittelte Antwort handelt, die sich weitestgehend resistent gegenüber kompetitiven Antagonisten für Glutamat-, GABA- und muskarinen Azetylcholin-Rezeptoren verhält (Schmitz, D. *et al.*, in Vorbereitung). Da diese Antwort auch nach der Applikation des NMDA-Rezeptorantagonisten APV zu sehen war, könnte es sich um eine der weniger APV-sensitiven Kombination (Buller & Monaghan, 1997) der NMDA-Rezeptoren (NR1-NR2C/NR2D) handeln. Ein weiterer Hinweis auf eine NMDA-vermittelte Antwort ergibt sich aus der Tatsache, daß der nicht-kompetitive NMDA-Rezeptorantagonist MK-801 diese verbleibende Antwort irreversibel unterdrückte (Schmitz, D. *et al.*, in Vorbereitung).

Es ist bekannt, daß Glutamattransporter für eine schnelle Beseitigung des freigesetzten Glutamats aus dem synaptischen Spalt innerhalb der ersten paar Millisekunden nach einem synaptischen Ereignis sorgen (Diamond & Jahr, 1997; Tong & Jahr, 1994) und dabei die postsynaptische Antwort an unterschiedlichen Synapsen modellieren (Barbour *et al.*, 1994; Mennerick *et al.*, 1999; Otis *et al.*, 1996; Overstreet *et al.*, 1999). Diese Wirkung beruht

vermutlich darauf, daß sie den 'Spillover' (das Überlaufen) von Glutamat zu angrenzenden Synapsen vermindern (Rusakov & Kullmann, 1998). Dies konnte unter anderem auch an Synapsen der CA1-Region des Hippocampus gezeigt werden, wo vor allem gliale Transporter das Ausmaß des 'Spillover' limitieren (Kullmann & Asztely, 1998). Zusätzlich konnte an den Moosfaser-Synapsen der CA3-Region eine Aktivierung präsynaptischer mGluRs nach Inhibition der Glutamattransporter nachgewiesen werden (Min *et al.*, 1998; Scanziani *et al.*, 1997; Vogt & Nicoll, 1999). Vermutet wurde nach ersten Untersuchungen, daß sich nach der Inhibition der Glutamattransporter das extrazelluläre Glutamat im synaptischen Spalt ansammelt, nachfolgend aus dem Spalt diffundiert und dadurch extrasynaptisch liegende, präsynaptische mGluRs aktiviert.

In dieser Arbeit gibt es zahlreiche Hinweise dafür, daß *L-trans*-2,4-PDC und DL-TBOA über einen präsynaptischen Mechanismus zur Reduktion der EPSC-Amplituden führt. Da die spezielle Vermittlung der präsynaptischen Inhibition durch die mGluRs in Studien festgestellt wurde, in denen ACPD und andere mGluR-Agonisten die exzitatorische synaptische Transmission in Hippocampuschnitten der Ratte in der CA1 reversibel unterdrückten (Baskys & Malenka, 1991; Desai & Conn, 1991; Maccaferri *et al.*, 1998), waren besonders die Ähnlichkeit und der Vergleich mit den unter Applikation des mGluR-Agonisten *trans*-(±)-ACPD gewonnenen Daten von Bedeutung:

1. Weder die Inhibition der EPSC-Amplituden durch *trans*-(±)-ACPD noch die durch *L-trans*-2,4-PDC und DL-TBOA ging mit postsynaptischen Veränderungen, wie Änderungen des Membranpotentials, des Eingangswiderstandes oder des Haltestromes einher. In zahlreichen Studien und an verschiedenen Synapsen (Übersichtsartikel: Anwyl, 1999) wurden diese Merkmale präsynaptischer durch *trans*-(±)-ACPD-vermittelter Inhibition untersucht.
2. Sowohl die beiden Transport-Inhibitoren als auch *trans*-(±)-ACPD reduzierten die durch NMDA-Rezeptoren vermittelten EPSCs in ungefähr dem gleichen Umfang wie die durch AMPA-vermittelten EPSCs. Auch hier liegen Untersuchungen für *trans*-(±)-ACPD vor (Baskys & Malenka, 1991; Lovinger, 1991), die einen unterschiedlichen Effekt des mGluR-Agonisten an postsynaptischen AMPA- oder NMDA-Rezeptoren ausschließen und auf eine präsynaptisch verminderte Transmitterausschüttung verweisen.
3. Untersuchungen spontaner Miniatur-EPSCs (mEPSCs) ergaben keine Änderung der Amplitude dieser Ströme unter Applikation von *L-trans*-2,4-PDC, was gegen eine Änderung der Rezeptorsensitivität spricht. So wäre eine Desensitisierung der postsynaptischen

non-NMDA-Rezeptoren aus einer Verkleinerung der mEPSC-Amplituden ersichtlich gewesen. Allerdings konnte in diesen Untersuchungen auch keine signifikante Änderung der Frequenz gezeigt werden. Es kam zwar insgesamt zu einer Frequenzverminderung, die aber aufgrund der großen Streuung der Daten nicht signifikant war. Insgesamt lassen die unveränderte Amplitude und die reduzierte Frequenz aber den Rückschluß auf einen möglichen präsynaptischen Mechanismus zu.

Ein weiteres Merkmal für einen präsynaptisch vermittelten Effekt ist die Vergrößerung des Index der Doppelpuls-Stimulation (PPI) (Clark *et al.*, 1994; Mennerick & Zorumski, 1995). Dabei muß berücksichtigt werden, daß nur eine gesteigerter PPI der AMPA-EPSCs ein eindeutiger Hinweis auf einen präsynaptischen Wirkmechanismus gibt, da nur die AMPA-vermittelten EPSCs spannungsunabhängig sind. Der Doppelpuls-Index der NMDA-EPSCs ist, ebenso wie die EPSCs an sich, abhängig von der Spannung und schließt postsynaptische Faktoren mit ein (Clark *et al.*, 1994). In Studien mit verschiedenen Agonisten metabotroper Glutamatrezeptoren konnte gezeigt werden, daß es in der CA1-Region (Baskys & Malenka, 1991; Gereau & Conn, 1995b), dem frontalen Cortex (Burke & Hablitz, 1995) und den Moosfasersynapsen in der Area CA3 (Kamiya *et al.*, 1996; Manzoni *et al.*, 1997) nur dann zu einer Erhöhung des PPI kommt, wenn die mGluRs der Gruppen I und III aktiviert werden. In der vorliegenden Arbeit hatten weder *trans*-(±)-ACPD noch *L-trans*-2,4-PDC einen Einfluß auf den Doppelpuls-Index, während DL-TBOA den PPI signifikant erhöhte und somit einen eindeutigen Hinweis auf einen präsynaptischen Mechanismus lieferte. Die Schwierigkeit mit *trans*-(±)-ACPD oder *L-trans*-2,4-PDC eine signifikante Wirkung auf den PPI zu beobachten, kann mehrere Ursachen haben. Zum einen besteht die Möglichkeit, daß der präsynaptische Effekt und damit die Reduktion der EPSC-Amplituden bei den gewählten Konzentrationen nicht maximal waren. Ähnliches ließ sich auch in Studien mit zusätzlich appliziertem Glutamat feststellen (Zorumski *et al.*, 1996). Eine andere Ursache kann aber auch die durch *trans*-(±)-ACPD und *L-trans*-2,4-PDC aktivierte Gruppe der mGluRs sein. Wie oben beschrieben, ließen sich Veränderungen des PPI nur bei Aktivierung der Gruppe I oder III mGluRs feststellen. Demzufolge ist es möglich, die unterschiedlichen Effekte damit zu erklären, daß DL-TBOA seine Wirkung auf die EPSP/EPSC-Amplituden über eine indirekte Aktivierung präsynaptischer mGluRs der Gruppe I oder III vermittelt, während *L-trans*-2,4-PDC und *trans*-(±)-ACPD eher die Gruppe II mGluRs aktivieren.

Die Existenz präsynaptischer mGluRs der Gruppen I bis III konnte durch Untersuchungen zu deren Beitrag auf die präsynaptische Inhibition der synaptischen Transmission z. B. in der basolateralen Amygdala (Rainnie & Shinnick-Gallagher, 1992), dem Locus coeruleus, d. h. in einem Kerngebiet des Hirnstamms (Dube & Marshall, 1997), dem Striatum (Pisani *et al.*, 1997) und für die Gruppe I im Hippocampus (Gereau & Conn, 1995a; Manzoni & Bockaert, 1995) gezeigt werden. In immunhistochemischen Studien konnte zusätzlich gezeigt werden, daß vor allem der Gruppe-I-Subtyp mGluR₅ sowohl im Cortex als auch im Hippocampus präsynaptisch in hoher Dichte vorkommen (Romano *et al.*, 1995). Ähnliche Untersuchungen liegen auch für die mGluRs der Gruppe II vor und konnten deren Existenz im mittleren Band des entorhinalen Cortex, d. h. Schicht III, IV und oberer Anteil der Schicht V, nachweisen. Die Gruppe-II-Subtypen mGluR_{2/3} treten dort in relativ hoher Dichte auf und sind sowohl prä- als auch postsynaptisch zu finden (Petreria *et al.*, 1996).

Um herauszufinden, welche Gruppe der mGluRs die durch die Transport-Inhibitoren hervorgerufene Wirkung vermittelte, wurden Untersuchungen mit MCPG (einem unspezifischen mGluR-Antagonisten der Gruppen I und II) durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Vorinkubation der Hirnschnitte mit MCPG die Wirkung der beiden Transport-Inhibitoren auf die EPSC-Amplituden stark gehemmt bzw. verhindert werden. Gleiches trifft auch für die durch *trans*-(±)-ACPD-vermittelte Wirkung zu. Nachfolgend kam der spezifische Gruppe II mGluR-Antagonist EGLU zum Einsatz und während MCPG die Wirkung von *L-trans*-2,4-PDC und DL-TBOA verhindern konnte, hatte die Vorinkubation der Hirnschnitte mit EGLU einen unterschiedlichen Einfluß auf die Wirkung der Transport-Inhibitoren. Im Fall von *L-trans*-2,4-PDC ließ sich die Amplitudenreduktion der EPSCs durch EGLU komplett verhindern, während die Reduktion der EPSC-Amplituden durch DL-TBOA unbeeinflusst blieb. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß im medialen entorhinalen Cortex die Wirkung der untersuchten Transport-Inhibitoren auf die EPSC-Amplituden vermutlich durch eine negative Rückkopplung über die metabotropen Glutamatrezeptoren der Gruppen I und II vermittelt wird.

Die durch Applikation von MCPG (unspezifischer Gruppe I und II mGluR-Antagonist) hervorgerufenen agonistischen Effekte wurden auch in anderen Studien gefunden. So wurde in der Amygdala eine Reduzierung der durch Glutamat evozierten EPSP durch ebendiese agonistische Wirkung von MCPG an den mGluRs gefunden (Keele *et al.*, 1995) und in kortikalen Synaptosomen der Ratte löste MCPG durch Aktivierung der Phospholipase D eine Translokation der PKC aus (Pastorini *et al.*, 1998; Pastorino *et al.*, 2000). Zusätzlich konnte

gezeigt werden, daß MCPG im Gyrus dentatus eine langanhaltende Depression durch eine zumindest teilweise agonistische Wirkung an Gruppe II mGluRs auslöst (Huang *et al.*, 1999a).

Die vorgestellten Daten können nicht ausschließen, daß *L-trans*-2,4-PDC selbst die mGluRs direkt aktiviert. Es ist zwar bewiesen, daß *L-trans*-2,4-PDC viermal langsamer als Glutamat bindet (Sarantis *et al.*, 1993), aber Miller *et al.* (1994) zeigten an Kulturen kortikaler Astrozyten, daß es ebenfalls als Agonist der mGluRs wirken kann. Dabei regt es in großem Umfang die Phosphoinositol-Hydrolyse (PI-Hydrolyse) an und führt zu einer Inhibition der Isoproterenol-stimulierten cAMP-Ansammlung. Und während der Effekt auf die PI-Hydrolyse nur bei relativ hohen Konzentrationen von *L-trans*-2,4-PDC (1mM) gesehen werden konnte, liegt seine Fähigkeit einerseits die cAMP-Akkumulation und andererseits die Glutamattransporter der Astrozyten zu inhibieren in einem ähnlichen Bereich (ca. 500 µM [Miller *et al.*, 1994]). In neueren Studien ließ sich, in Übereinstimmung mit der von Miller *et al.* (1994) beobachteten Stimulierung der PI-Hydrolyse, in hippocampalen Synaptosomen durch *L-trans*-2,4-PDC eine Erhöhung der Ca²⁺-unabhängigen Glutamatfreisetzung beobachten, die der des Gruppe I Agonisten *trans*-Azetidine-2,4-Dicarboxylat gleicht (Manahan-Vaughan *et al.*, 1999). Aufgrund dieser Untersuchungen und auf der Basis der hier vorgestellten Ergebnisse kann man vermuten, daß die durch *L-trans*-2,4-PDC-vermittelte Amplitudenreduktion der EPSCs vor allem durch eine direkte agonistische Wirkung an den mGluRs der Gruppe II zustande kam.

4.3 Mechanismen der Inhibition

4.3.1 Kopplung an G-Proteine und intrazelluläre Botenstoffe

Bezüglich der Kopplung an die verschiedenen G-Proteine, gibt es inzwischen Hinweise, daß die mGluR-vermittelte Inhibition der synaptischen Transmission über ein Pertussis-Toxin (PTX)-sensitives G-Protein erfolgt. So konnte in kultivierten corticostriatalen Neuronen (Tyler & Lovinger, 1995) und Mitralzellen des Bulbus olfactorius (Trombley & Westbrook, 1992) nach längerer Inkubation mit PTX kaum noch eine 1*S*,3*R*-ACPD-induzierte Inhibition der exzitatorischen synaptischen Transmission festgestellt werden. PTX-sensitive G-Proteine kommen vor allem bei den Gruppe II mGluRs zum Einsatz, während die der Gruppe I sowohl PTX-sensitive als auch PTX-insensitive G-Proteine benutzen (Choi & Lovinger, 1996).

Es gibt keine Hinweise, daß die über mGluRs vermittelte präsynaptische Inhibition über eine Aktivierung der PKC oder PKA erfolgt. In Studien mit selektiven Inhibitoren der PKC bzw. PKA konnte gezeigt werden, daß diese keinen hemmenden Einfluß auf die durch DCG-IV (ein Agonist der Gruppe II mGluRs) induzierte präsynaptische Hemmung im Gyrus dentatus haben (Huang *et al.*, 1999b). Darüber hinaus ist bekannt, daß PKC- und PKA-anregende Substanzen, wie Phorbol ester und Forskolin, die synaptische Transmission eher anregen als unterdrücken. Dabei wurde auch gezeigt, daß Phorbol ester und Forskolin in der Lage sind, die präsynaptischen Effekte der mGluR-Agonisten zu überdecken (Kamiya & Yamamoto, 1997; Maccaferri *et al.*, 1998; Redman, 1990; Swartz, 1993; Tyler & Lovinger, 1995). Auf der Basis dieser Ergebnisse wird vermutet, daß die präsynaptische Inhibition negativ an die PKC und cAMP-abhängige Prozesse gekoppelt ist (Kamiya & Yamamoto, 1997; Maccaferri *et al.*, 1998).

4.3.2 Involvierte Ionenkanäle

Bis heute werden drei Haupttheorien als Ursache für die mGluR-vermittelte Inhibition der Freisetzung erregender Transmitter angesehen: die Unterdrückung einer präsynaptischen Ca^{2+} -Leitfähigkeit, die Aktivierung präsynaptischer K^+ -Kanäle und eine direkte Inhibition über Proteine, die für die Transmitterfreisetzung verantwortlich sind (Übersichtsartikel: Anwyl, 1999).

Es konnte gezeigt werden, daß Aktivierung der Gruppe I und II mGluRs die Aktivität der Ca^{2+} -Kanäle des Typs N in Neuronen kortikaler Hirnschnitte reduziert (Choi & Lovinger, 1996) und die des Typs L in kultivierten hippocampalen Neuronen (Sahara & Westbrook, 1993). Des weiteren war es durch den Einsatz von Phorbol estern möglich, die mGluR-vermittelte Inhibition dieser Ca^{2+} -Kanäle zu blockieren (Kamiya & Yamamoto, 1997). Zusätzlich scheinen diese Kanäle an der Moosfaserterminale eine Rolle bei der Transmitterfreisetzung zu spielen (Castillo *et al.*, 1994) und es war möglich, sie durch Aktivierung der mGlu₂ (mGluR der Gruppe II) in neuronalen heterologen Expressionssystemen zu inhibieren (Ikeda *et al.*, 1995). Vor allem die signifikante Erhöhung des Doppelpuls-Index durch DL-TBOA weist in der vorliegenden Arbeit auf einen Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus hin.

Die Theorie, daß mGluR-Agonisten die Transmitterfreisetzung über eine erhöhte K^+ -Leitfähigkeit hemmen, wurde auf der Grundlage von Experimenten entwickelt in denen 4-Aminopyridin (4-AP, K^+ -Kanal-Blocker) die durch *trans*-(±)-ACPD hervorgerufene Hem-

mung der evozierten EPSPs/EPSCs verhinderte (z.B. Anwyl, 1999; Lovinger *et al.*, 1993). Eine Interpretation wäre, daß die Stimulation der mGluRs in einer Aktivierung eines 4-AP-sensitiven K^+ -Kanals resultiert, der nahe an der Axonterminale liegt. Diese Aktivierung von K^+ -Kanälen würde in einer verminderten Depolarisation der Terminale, einem nachfolgend verminderten Ca^{2+} -Einstrom und verminderter Transmitterfreisetzung resultieren (Übersichtsartikel: Anwyl, 1999). Es sollte allerdings hervorgehoben werden, daß die Unterbindung der mGluR-vermittelten Inhibition durch 4-AP keinen Rückschluß auf eine allgemein gültige "Aktionsstelle" zuläßt. Nichtsdestotrotz haben neuere elektrophysiologische und anatomische Studien inzwischen den Beweis erbracht, daß ein durch 4-AP blockierbarer präsynaptischer auswärtsgerichteter K^+ -Strom durch 1S,3R-ACPD und L-AP4 (Agonist der Gruppe III mGluRs) an den Riesenaxonen des Neunauges aktiviert werden kann (Cochilla & Alford, 1998), und daß 4-AP-sensitive K^+ -Kanäle in den Axonterminalen nahe der Freisetzungzone vorkommen (Cooper *et al.*, 1998). In diesen Studien konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung präsynaptischer K^+ -Kanäle durch mGluR-Agonisten sowohl eine Reduktion der Aktionspotentialamplitude als auch eine Erhöhung der Aktionspotentialschwelle mit einschließt (Cochilla & Alford, 1998). Diese Effekte konnten in dieser Arbeit nicht beobachtet werden und beruhen vermutlich eher auf einer Aktivierung der Gruppe III mGluRs, wobei die Möglichkeit in Betracht gezogen werden muß, daß 1S,3R-ACPD beim Neunauge die Gruppe III mGluRs aktivieren könnte (Cochilla & Alford, 1998).

Hinweise dafür, daß mGluRs bei der Blockade der Glutamatfreisetzung präsynaptisch entgegen dem Gradienten des Ca^{2+} -Einstromes agieren, z.B. durch direkte Modulation der molekularen Ereignisse, die dem Andocken und der Fusion der Vesikel zugrunde liegen, konnten in einigen Studien zu spontanen mEPSPs/EPSCs gefunden werden. Vorgenommen wurden diese Studien unter anderem am visuellen Cortex (Sladeczek *et al.*, 1993), Hirnschnittkulturen der CA3-Region (Scanziani *et al.*, 1995), dem frontalen Cortex (Burke & Hablitz, 1995), kultivierten corticostriatalen Synapsen (Tyler & Lovinger, 1995) und der Area CA1 (Gereau & Conn, 1995b) und es zeigte sich, daß mGluR-Agonisten die Frequenz, aber nicht die Amplitude, der mEPSPs/EPSCs reduzieren. Durch mEPSPs wird die basale synaptische Transmission widerspiegelt, die unabhängig vom Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle ist. Belegt wird dies durch Studien, in denen Cd^{2+} , welches spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle verschließt und die evozierten EPSPs inhibiert, die Frequenz der mEPSC in Gegenwart von TTX unverändert ließ (Gereau & Conn, 1995b; Scanziani *et al.*, 1992; 1995). Zusätzlich wurde ebendort gezeigt, daß die mGluR-vermittelte präsynaptische

Inhibition der mEPSC-Frequenz nicht durch Aktivierung präsynaptischer Ca^{2+} -Kanäle vergrößert wurde. Ebenso ließ sich feststellen, daß die Frequenz durch Aktivierung unterschiedlicher mGluRs verschieden beeinflusst wird (Gereau & Conn, 1995b). Das Hauptproblem bei Untersuchungen zur Frequenz von mEPSP/EPSCs liegt darin, daß die zugrundeliegenden Mechanismen der Transmitterfreisetzung bei mEPSPs nicht direkt mit der evozierten Transmitterfreisetzung in Beziehung stehen. So kann die Ruhefrequenz der mEPSPs unabhängig von der aktiven Zone der Transmitterfreisetzung sein, an der die evozierte Transmitterfreisetzung mit dem dafür erforderlichen Ca^{2+} -Einstrom erfolgt (Kimura *et al.*, 1997). Folglich können Agonisten der metabotropen Glutamatrezeptoren eine präsynaptische Beeinflussung der mEPSPs über eine Stelle vermitteln, die fern von den Ca^{2+} -Kanälen liegt. Diese Beeinflussung würde dann zusätzlich zu der mGluR-vermittelten Hemmung der evozierten Freisetzung existieren.

Beweise für einen ungewöhnlichen Mechanismus der Hemmung Gruppe II mGluR-vermittelter Transmitterfreisetzung konnte in der Area CA1 adulter Ratten gefunden werden. In dieser Region können bei adulten Tieren keine präsynaptischen mGluRs der Gruppe II gefunden werden. In diesem Fall erfolgte eine Ko-Aktivierung der Gruppe II mGluRs (evtl. mGlu₃) der Gliazellen zusammen mit β -adrenergen Rezeptoren, die zur Freisetzung von cAMP oder Adenosin führte, nachfolgend präsynaptische Adenosinrezeptoren aktivierte und letzten Endes in einer reduzierten synaptischen Transmission gipfelte (Gereau & Conn, 1995b; Winder *et al.*, 1996).

Für die vorliegenden intrazellulären Untersuchungen an Neuronen der Schicht III des mEC läßt sich zusammenfassend feststellen, daß beide Transport-Inhibitoren die erregende synaptische Transmission wahrscheinlich über eine Aktivierung präsynaptischer metabotroper Glutamatrezeptoren der Gruppen I und II hemmen. Dabei konnte festgestellt werden, daß diese Hemmung unter Applikation von DL-TBOA vermutlich nur über die Gruppe I der mGluRs erfolgt, während L-*trans*-2,4-PDC seine Wirkung vor allem über eine Aktivierung der Gruppe II vermittelt. Dabei kann davon ausgegangen werden, daß L-*trans*-2,4-PDC in der benutzten Konzentration die mGluRs der Gruppe II direkt aktiviert und der Effekt nicht nur präsynaptisch vermittelt wird. Vermutet wurde, daß es nach Inhibition der Glutamatttransporter während der synaptischen Transmission zu einer verstärkten Akkumulation von Glutamat im synaptischen Spalt kommt. Dieses ist dadurch in der Lage, aus dem synaptischen Spalt zu diffundieren, die präsynaptischen mGluRs der Gruppe I zu aktivieren und über diesen negati-

ven Rückkopplungsmechanismus die Transmitterfreisetzung zu vermindern. Zumindest für DL-TBOA läßt sich dieser Weg eindeutig bestätigen.

Darauf, daß die durch glutamaterge Autorezeptoren vermittelte Hemmung vor allem durch präsynaptische mGluRs bedingt wurde, gibt es mehrere Hinweise. Am eindeutigsten ist die signifikante Erhöhung des Doppelpuls-Index nach Applikation von DL-TBOA. Wie weiter oben erwähnt, kann der nicht vorhandene Effekt von *L-trans*-2,4-PDC auf den PPI kontrovers diskutiert werden. Er kann einerseits darauf beruhen, daß die präsynaptische Wirkung und die daraus resultierende Amplitudenreduktion nicht maximal war und andererseits mit der durch *L-trans*-2,4-PDC aktivierten Gruppe der mGluRs zusammen hängen. Dieser letzte Punkt würde dann erneut für eine direkte Aktivierung prä- oder postsynaptischer Gruppe II mGluRs durch *L-trans*-2,4-PDC sprechen. Auf einen präsynaptischen Wirkungsort weisen hier die Tatsachen hin, daß keine Veränderungen in den postsynaptischen Membraneigenschaften (Veränderungen des Membranpotentials oder des Eingangswiderstandes) und eine Reduzierung der Frequenz der spontanen mEPSCs beobachtet wurden, auch wenn letztere aufgrund der Streuung der Daten nicht signifikant war.

Die beobachtete Hemmung der exzitatorischen Transmission scheint unabhängig von präsynaptischen K^+ -Kanälen zu sein und eher auf der Unterdrückung einer präsynaptischen Ca^{2+} -Leitfähigkeit zu beruhen. Vermutlich werden dabei die Ca^{2+} -Kanäle der Typen N und L inhibiert, ein Effekt der zumindest für den Typen N auf PTX-sensitive G-Proteine schließen läßt, die von Gruppe I und II mGluRs benutzt werden.

4.4 Wirkung der Glutamat-Transport-Inhibitoren auf die Feldpotentiale von Wildtyp- und EAAC1-knockout-Mäusen

Erste extrazelluläre Untersuchungen der Schichten III und V des mEC von Wildtyp- und EAAC1-knockout-Mäusen konnten zeigen, daß das Fehlen des Glutamatttransporters EAAC1 generell keinen Einfluß auf die Feldpotentiale unter Kontrollbedingungen hatte. Wie auch bei der Ratte ließen sich bei den Mäusen komplexe Feldpotentialantworten evozieren, die aus einer frühen und späten negativen Komponente sowie einer dazwischen liegenden positiven Komponente bestanden. Da schon bei der Ratte gezeigt wurde, daß *L-trans*-2,4-PDC die Feldpotentiale der Schichten III und V in gleicher Weise beeinflußt, beschränkten sich die Messungen zu diesem Transport-Inhibitor auf die Schicht III des mEC der Wildtypen und Knockout-Mäuse.

Bei den Wildtyp-Mäusen reduzierten sowohl *L-trans*-2,4-PDC als auch DL-TBOA signifikant sämtliche Komponenten der evozierten Feldpotentiale in den Schichten III (*L-trans*-2,4-PDC, DL-TBOA) und V (DL-TBOA). Dabei ließ sich beim Vergleich der Wirkung der beiden Inhibitoren auf die einzelnen Komponenten kein Unterschied feststellen (Schicht III). Wie schon bei den Untersuchungen an der Ratte erwähnt, könnte die Amplitudenreduzierung durch eine Desensitisierung postsynaptischer GluRs zustande gekommen sein. Aber auch hier spricht die Tatsache, daß keine Unterschiede in den Zeitverläufen der Feldpotentiale beobachtet wurden, gegen eine solche Möglichkeit. Aufgrund der intrazellulär erhobenen Befunde an der Ratte, wird auch bei den Mäusen davon ausgegangen, daß beide Transport-Inhibitoren indirekt über präsynaptische metabotrope Glutamatrezeptoren einen negativen Rückkopplungsmechanismus in Gang setzen, der die Transmitterausschüttung reduziert.

Ein etwas anderes Bild ergibt sich jedoch bei der Wirkung der Transport-Inhibitoren auf die Feldpotentiale der EAAC1-knockout-Mäuse. Bei dem nicht-kompetitiven Transport-Inhibitor DL-TBOA konnte erneut eine Reduktion sämtlicher Komponenten der evozierten Feldpotentiale beobachtet werden. Beim Vergleich zwischen Wildtyp- und EAAC1-knockout-Mäusen zeigten sich keine Unterschiede in der Amplitudenreduktion. Dies weist darauf hin, daß auch hier die Wirkung von DL-TBOA präsynaptisch über eine negative Rückkopplungsschleife wirkt. Das Ausschalten des neuronalen Transporters EAAC1 scheint daher keinen Einfluß auf die Wirkungsweise nicht-kompetitiver Transportinhibitoren zu haben.

Bei den Untersuchungen zu dem kompetitiven Transport-Inhibitor *L-trans*-2,4-PDC hingegen kam es nur bei der positiven und der zweiten negativen Komponente zu einer signifikanten Verkleinerung der Amplituden, die keine Unterschiede zu der Amplitudenreduktion bei den Wildtyp-Mäusen aufwies. Die erste negative Komponente hingegen wurde signifikant vergrößert, ein Effekt der sich nach ca. 60-minütigem Auswaschen von *L-trans*-2,4-PDC noch vergrößerte. Diese Wirkung ist der an den Wildtyp-Mäusen beobachteten völlig entgegengesetzt. Eine mögliche Erklärung ist, daß die Blockade der Transporter einen Anstieg der extrazelluläre Glutamatkonzentration $[Glu]_o$ bewirkt. Allerdings hätte dann auch unter Applikation des wesentlich effektiveren DL-TBOA eine Potenzierung der Amplitude gesehen werden müssen. In früheren Studien konnte gezeigt werden, daß kompetitive Transport-Inhibitoren unter bestimmten Bedingungen die Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren über einen Heteroexchange (Abbildung 33) hervorrufen können (Jabaudon *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2000; Velasco *et al.*, 1996; Volterra *et al.*, 1996; Ye *et al.*, 1999; Ye & Sontheimer, 1999). So konnte bei experimentell induzierten ischämischen Zuständen eine erhöhte $[Glu]_o$ festgestellt werden (Jabaudon *et al.*, 2000; Rossi *et al.*, 2000). Für diese Erhöhung können zwei

Mechanismen verantwortlich sein: Zum einen kann die anoxische Depolarisation über eine positive Rückkopplung vermittelt werden (Rossi *et al.*, 2000). Dabei kommt es zu einem Anstieg der extrazellulären K^+ -Konzentration $[K^+]_o$ und der intrazellulären Na^+ -Konzentration $[Na^+]_i$ und nachfolgend zu einer erhöhten Freisetzung von Glutamat, d.h. zu einer Umkehr der Glutamattransporter (Abbildung 33, reverse uptake). Die zweite Möglichkeit besteht darin, daß L-trans-2,4-PDC über Transporter aufgenommen und gegen Glutamat ausgetauscht wird (Abbildung 33, heteroexchange). D.h., der Transporter nimmt ein Molekül auf, welches die ionotropen Glutamatrezeptoren kaum bzw. gar nicht aktiviert (L-trans-2,4-PDC) und setzt dafür einen effektiveren Aktivator (Glutamat) frei (Volterra *et al.*, 1996). Vermutet wird, daß sowohl der umgekehrte Transport als auch der Heteroexchange über präsynaptische Glutamattransporter erfolgen, da es Hinweise dafür gibt, daß präsynaptische Endigungen Glutamat aufnehmen können (Gundersen *et al.*, 1993; 1996). Bis heute konnte jedoch keiner der bekannten Transporter in den Axonterminalen identifiziert werden (Arriza *et al.*, 1997; Conti *et al.*, 1998; Gegelashvili & Schousboe, 1997; Vandenberg, 1998). Zusätzlich besitzen Neuronen eine höhere intrazelluläre Glutamatkonzentration als Gliazellen (Ottersen *et al.*, 1992; Torp *et al.*, 1992), die zur Umkehr der Transporter beitragen könnte, wenn die synaptischen Vesikel aufgrund der gefallenen ATP-Konzentration bei Ischämien ihr Glutamat an das Cytoplasma abgeben (Rossi *et al.*, 2000).

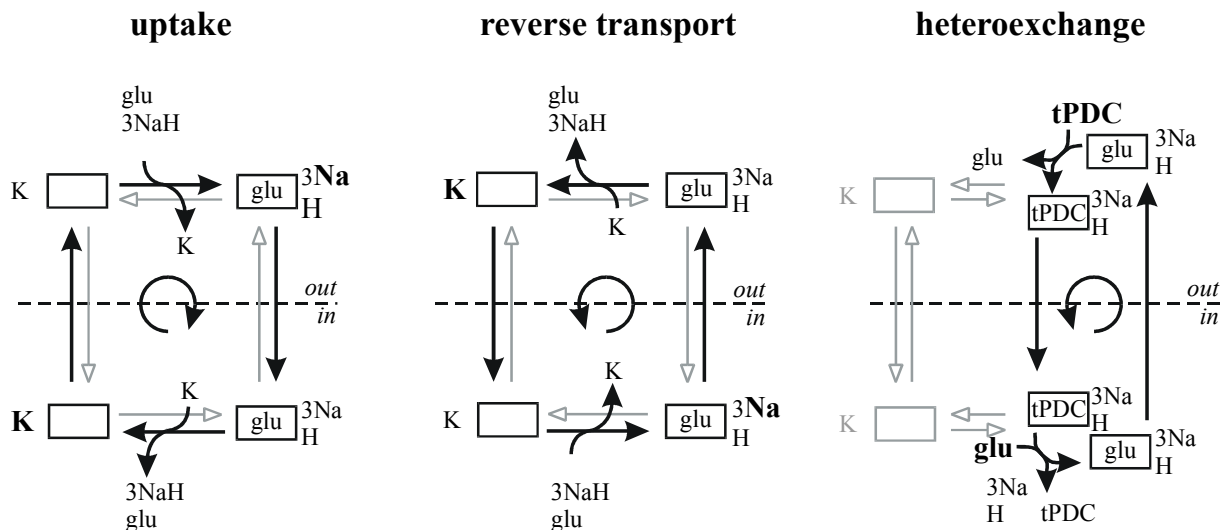


Abbildung 33

Glutamatfreisetzung kann durch umgekehrten Transport (reverse transport) oder Heteroexchange erfolgen. L-trans-2,4-PDC (tPDC) kann zum "glu/3Na⁺/H⁺ inside"-Zustand des Transporters führen. Dadurch wird Glutamat (glu) dann freigesetzt (aus: Jabaudon *et al.*, 2000).

Ein indirekter Mechanismus könnte allerdings auch sein, daß *L-trans*-2,4-PDC selbst in den Gliazellen in Glutamin umgewandelt wird. Demzufolge würde mehr Glutamin in die präsynaptischen Terminalen transportiert werden und dort eine erhöhte intrazelluläre Glutamatkonzentration bedingen. Nachfolgend würde dann bei einer synaptischen Reizung mehr Glutamat freigesetzt und der extrazelluläre Glutamatspiegel erhöht.

In der vorliegenden Arbeit ist die Amplitudenpotenzierung der ersten negativen Komponente der Feldpotentiale in EAAC1-knockout-Mäusen durch *L-trans*-2,4-PDC am wahrscheinlichsten auf einen Heteroexchange zurück zu führen. Dabei ist nicht klar, ob die Freisetzung des Glutamats (oder Glutamins) über einen der glialen Transporter vermittelt wird, oder ob ein präsynaptischer, noch nicht identifizierter Glutamattransporter existiert. Ebenso unklar bleibt, ob in diesen Prozeß metabotrope Glutamatrezeptoren involviert sind.

4.5 Ausblick – Glutamattransporter und Krankheiten des ZNS

Die Fehlfunktion der Glutamattransporter wird mit einigen pathologischen Veränderungen des ZNS in Verbindung gebracht (Übersichtsartikel: Robinson, 1999; Sims & Robinson, 1999). Hinweise für einen verringerten Glutamattransport konnten bei Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose (ALS) gefunden werden. Diese Veränderungen beschränkten sich vor allem auf Gebiete, die mit dieser Krankheit in Verbindung gebracht werden, wie dem Rückenmark, dem motorischen und dem somatosensorischen Cortex, und konnten nicht im Gewebe von Alzheimer-Patienten und Patienten mit Chorea Huntington gesehen werden. Neuere Studien erbrachten, daß vor allem ein selektiver Verlust von GLT-1 im motorischen Cortex und dem Rückenmark für die ALS verantwortlich ist (Ludolph *et al.*, 1998; Rothstein *et al.*, 1995). Weiterhin wurde festgestellt, daß in diesen Regionen deutlich weniger Parvalbumin, das als Ca^{2+} -Puffer fungiert, exprimiert wird, so daß die GLT-1-Dysfunktion zu einer erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentration führt und damit die Vulnerabilität der Zellen gegenüber der Ca^{2+} -vermittelten Exzitotoxizität erhöht (Medina *et al.*, 1996). An Kulturen des Rückenmarks konnte inzwischen ein Modell der ALS etabliert werden, in dem gezeigt wurde, daß die Inhibition der Glutamattransporter zu einem graduellen Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration und einem nachfolgenden, über Wochen und Monate anhaltenden, Verlust der Motoneurone führte. Zusätzlich zeigten mehrere Studien, daß dieser Verlust auf eine non-NMDA-vermittelte Toxizität zurück zu führen ist (Danbolt, 1994; Sims & Robinson, 1999). Studien an Transporter-defizienten Mäusen ergaben, daß dabei vor allem die glialen

Transporter GLT-1 und GLAST eine Rolle spielen, während das Ausschalten von EAAC1 keine neurodegenerativen Effekte hatte (Peghini *et al.*, 1997; Sims & Robinson, 1999).

Exzitotoxischer Tod von Neuronen spielt vermutlich auch bei der Alzheimer-Demenz eine Rolle (Sims & Robinson, 1999). Unterschiede in der Bindung von D-[³H]-Aspartat konnten zwischen normalen und geschädigten Hirnregionen von Alzheimer-Patienten gefunden werden (Scott *et al.*, 1995). Direktere Beweise für eine Beeinträchtigung des Glutamattransports ließen sich in Kulturen hippocampaler Astrozyten und kortikaler Synaptosomen durch Applikation des Proteins β -Amyloid finden (Keller *et al.*, 1997a). Dieses Protein reduziert die Glutamataufnahme und spielt eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Alzheimer-Demenz. Verhindern ließ sich dieser Effekt durch ein Antioxidant, was darauf hinweist, daß die Dysfunktion der Glutamattransporter auf der Formation freier Radikale beruht. In der Tat konnte in kortikalen Synaptosomen gezeigt werden, daß ein Peroxidationsprodukt des β -Amyloids, das 4-Hydroxynonenal, die Glutamataufnahme vermindert. Dabei ist es in der Lage, sich über redoxsensitive Seiten mit dem GLT-1 zu verbinden (Keller *et al.*, 1997b).

Wenn die Energieversorgung des Gehirns unzureichend ist (Hypoxie, Hypoglykämie, Ischämie) werden toxische Mengen an Glutamat freigesetzt. Dafür wird vor allem ein umgekehrter Glutamattransport verantwortlich gemacht (Rossi *et al.*, 2000; Szatkowski *et al.*, 1990). Dies beruht darauf, daß die treibenden Kräfte für die Glutamattransporter (Membranpotential, elektrochemischer Gradient) vermindert sind und die hohen intrazellulären Glutamatkonzentrationen sowie die Verarmung an ATP die neuronalen Transporter umkehren (Übersichtsartikel: Danbolt, 1994; Sims & Robinson, 1999). Die Glutamataufnahme in Glia-Zellen ist bei diesen Vorgängen weniger involviert und konnte auch unter hypoxischen Zuständen aufrecht erhalten werden (Swanson, 1992).

Eine mögliche Beteiligung der Glutamattransporter wurde auch in verschiedenen Tiermodellen der Epilepsie untersucht. Allerdings läßt sich aus den Studien keine eindeutige Beteiligung erklären. So konnte in gekindelten Ratten keine oder nur eine geringfügig verminderte Transporteraktivität beobachtet werden (Miller *et al.*, 1997). Durch *in situ* Hybridisierung konnte in verschiedenen Hirnregionen eine Verminderung der GLT-1 mRNA und im Striatum eine Verminderung der EAAC1 mRNA beobachtet werden, jedoch wurde dabei kein signifikantes Ausmaß erreicht (Meldrum *et al.*, 1999).

Eine erhöhte Aktivität der Transporter könnte in einer glutamatergen Hypofunktion resultieren, welche als pathophysiologischer Mechanismus der Schizophrenie diskutiert wird (Carlsson *et al.*, 2000; Carlsson & Carlsson, 1990). Dies ist jedoch noch nicht abschließend geklärt (Olney, 1990).

5 Zusammenfassung

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem der Säugetiere. Die präzise Kontrolle des extrazellulären Glutamatspiegels ist für eine normale synaptische Transmission wichtig und erforderlich, um die Neurone vor Exzitotoxizität zu schützen. Im Gehirn scheinen vor allem verschiedene hochaffine Na^+ -abhängige Glutamattransporter für diese Kontrolle zu sorgen. Bis heute sind fünf verschiedene dieser Transporter identifiziert, von denen drei (GLAST, GLT-1 und EAAC1) in hoher Dichte im Hippocampus und im Cortex zu finden sind. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, welchen Einfluß die Inhibition der Glutamattransporter auf die exzitatorische synaptische Transmission in den Schichten III und V des mEC hat. In der Schicht III des mEC werden bei Krankheiten wie Alzheimer-Demenz, Schizophrenie und Epilepsie häufig Zellschädigungen und Zellverluste beobachtet. Vermutet wurde nach anfänglichen Untersuchungen, daß sich nach der Inhibition der Glutamattransporter das extrazelluläre Glutamat im synaptischen Spalt ansammelt, nachfolgend aus dem Spalt diffundiert und dadurch extrasynaptisch liegende, präsynaptische mGluRs aktiviert.

In den Untersuchungen wurde in der mittleren Schicht des lateralen entorhinalen Cortex stimuliert und je nach Fragestellung in den Schichten III und V (extrazellulär) bzw. nur in der Schicht III (intrazellulär, patch-clamp) des mEC abgeleitet.

Anhand der extrazellulären Messungen in den Schichten III und V der Ratte konnte gezeigt werden, daß die verwendeten Transport-Inhibitoren signifikant die negativen Feldpotentialkomponenten beider Schichten reduzierten. Diese Depression wies keinen signifikanten schichtspezifischen Unterschied auf, was darauf schließen läßt, daß die Glutamatregulation in beiden Schichten ähnlich ist. Für die anschließenden intrazellulären Messungen wurden aus diesem Grund nur noch Zellen der Schicht III untersucht. Sowohl der kompetitive Transport-Inhibitor *L-trans*-2,4-PDC als auch das nicht-kompetitive DL-TBOA reduzierten die Amplituden der pharmakologisch isolierbaren EPSCs. Diese reduzierende Wirkung konnte durch einen Agonisten der Gruppe I und II mGluRs, das *trans*-(±)-ACPD, nachgeahmt werden. Doppelpuls-Experimente und Untersuchungen an mEPSCs wiesen auf einen präsynaptisch vermittelten Wirkmechanismus hin. Die Vorinkubation der Hirnschnitte mit dem unspezifischen Gruppe I und II mGluR-Antagonisten MCPG verhinderte die durch *trans*-(±)-ACPD hervorgerufene Amplitudenreduktion und auch den reduzierenden Effekt der beiden Transport-Inhibitoren. In nachfolgenden Experimenten mit dem spezifischen Gruppe II mGluR-Antagonis-

ten EGLU konnte dieser zwar die durch *L-trans*-2,4-PDC hervorgerufene Wirkung verhindern, nicht aber den durch DL-TBOA vermittelten Effekt.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß beide Transport-Inhibitoren die erregende synaptische Transmission über eine Aktivierung präsynaptischer metabotroper Glutamatrezeptoren der Gruppen I und II hemmen. Dabei konnte festgestellt werden, daß diese Hemmung unter Applikation von DL-TBOA vermutlich nur über die Gruppe I der mGluRs erfolgt, während *L-trans*-2,4-PDC seine Wirkung vor allem über eine Aktivierung der Gruppe II vermittelt. Dabei kann davon ausgegangen werden, daß *L-trans*-2,4-PDC in der benutzten Konzentration die mGluRs der Gruppe II direkt aktiviert und der Effekt nicht nur präsynaptisch vermittelt wird. Die indirekte Aktivierung kommt vermutlich dadurch zustande, daß es nach Inhibition der Glutamattransporter während der synaptischen Transmission zu einer verstärkten Akkumulation von Glutamat im synaptischen Spalt kommt. Dieses ist dadurch in der Lage, aus dem synaptischen Spalt zu diffundieren, die präsynaptischen mGluRs der Gruppe I zu aktivieren und über diesen negativen Rückkopplungsmechanismus die Transmitterfreisetzung zu vermindern. Zumindest für DL-TBOA läßt sich dieser Weg eindeutig bestätigen.

Extrazelluläre Ableitungen an Wildtyp- und Knockout-Mäusen (letzteren fehlte der neuronale Transporter EAAC1) bestätigen im Prinzip diesen Wirkmechanismus der beiden Transport-Inhibitoren. Eine Ausnahme bildet allerdings die Wirkung von *L-trans*-2,4-PDC auf die Feldpotentiale der EAAC1-knockout-Mäuse. Während DL-TBOA alle Komponenten der Feldpotentiale der Knockout-Tiere reduziert, kommt es unter Applikation des kompetitiven *L-trans*-2,4-PDC zu einer signifikanten Vergrößerung der ersten negativen Feldpotentialkomponente der EAAC1-knockout-Mäuse. Diese Amplitudenpotenzierung ist vermutlich auf eine, durch Heteroexchange vermittelte, gestiegene extrazelluläre Glutamatkonzentration zurück zu führen. Dabei nimmt der Transporter ein Molekül auf, welches die ionotropen Glutamatrezeptoren kaum bzw. gar nicht aktiviert (*L-trans*-2,4-PDC) und setzt dafür einen effektiveren Aktivator (Glutamat) frei. Ein indirekter Mechanismus könnte allerdings auch sein, daß *L-trans*-2,4-PDC selbst in den Gliazellen in Glutamin umgewandelt wird. Demzufolge würde mehr Glutamin in die präsynaptischen Terminalen transportiert werden und dort eine erhöhte intrazelluläre Glutamatkonzentration bedingen. Nachfolgend würde dann bei einer synaptischen Reizung mehr Glutamat freigesetzt und der extrazelluläre Glutamatspiegel erhöht.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht nicht hervor, ob die Glutamatfreisetzung über einen der glialen Transporter vermittelt wird, oder ob ein präsynaptischer, noch nicht identifizierter Glutamattransporter existiert. Ebenso unklar bleibt, ob in diesen Prozeß metabotrope Glutamatrezeptoren involviert sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß zumindest der nicht-kompetitive Transport-Inhibitor DL-TBOA die präsynaptische Transmitterausschüttung in der Schicht III des mEC der Ratte über einen negativen Rückkopplungsmechanismus vermindert. Diese negative Rückkopplung wird durch präsynaptische mGluRs der Gruppe I vermittelt. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse zu *L-trans*-2,4-PDC hingegen lassen vermuten, daß dieser kompetitive Transport-Inhibitor in der benutzten Konzentration die mGluRs der Gruppe II direkt aktiviert und der Effekt nicht nur präsynaptisch vermittelt wird. Untersuchungen an EAAC1-knockout-Mäusen zeigten außerdem, daß *L-trans*-2,4-PDC in der Lage ist, die präsynaptische Glutamatfreisetzung zu erhöhen. Der gestiegenen extrazellulären Glutamatkonzentration liegt vermutlich ein Heteroexchange zugrunde.

6 Literatur

Abdul-Ghani, M. A., Valiante, T. A., Carlen, P. L. & Pennefather, P. S. (1996). Metabotropic glutamate receptors coupled to IP₃ production mediate inhibition of I_{AHP} in rat dentate granule neurons. *J. Neurophysiol.* **76**, 2691-2700.

Albani-Torregrossa, S., Attucci, S., Marinozzi, M., Pellicciari, R., Moroni, F. & Pellegrini-Giampietro, D. E. (1999). Antagonist pharmacology of metabotropic glutamate receptors coupled to phospholipase D activation in adult rat hippocampus: focus on (2R,1'S,2'R,3'S)-2-(2'-carboxy-3'-phenylcyclopropyl)glycine versus 3, 5- dihydroxyphenylglycine. *Mol. Pharmacol.* **55**, 699-707.

Alzheimer, C., Schwindt, P. C. & Crill, W. E. (1993a). Modal gating of Na⁺ channels as a mechanism of persistent Na⁺ current in pyramidal neurons from rat and cat sensorimotor cortex. *J. Neurosci.* **13**, 660-673.

Alzheimer, C., Schwindt, P. C. & Crill, W. E. (1993b). Postnatal development of a persistent Na⁺ current in pyramidal neurons from rat sensorimotor cortex. *J. Neurophysiol.* **69**, 290-292.

Amaral, D. G. & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience* **31**, 571-591.

Andersen, P., Bliss, T. V. P. & Skrede, K. K. (1971). Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp. Brain Res.* **13**, 222-238.

Anwyl, R. (1999). Metabotropic glutamate receptors: electrophysiological properties and role in plasticity. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **29**, 83-120.

Aprison, M. H. & Lipkowitz, K. B. (1989). On the GABA_A receptor: A molecular modeling approach. *J. Neurosci. Res.* **23**, 129-135.

Arriza, J. L., Eliasof, S., Kavanaugh, M. P. & Amara, S. G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**, 4155-4160.

Arriza, J. L., Fairman, W. A., Wadiche, J. I., Murdoch, G. H., Kavanaugh, M. P. & Amara, S. G. (1994). Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J. Neurosci.* **14**, 5559-5569.

Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P., Fairman, W. A., Wu, Y. N., Murdoch, G. H., North, R. A. & Amara, S. G. (1993). Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J. Biol. Chem.* **268**, 15329-15332.

- Ascher, P., Bregestovski, P. & Nowak, L. (1988). N-methyl-D-aspartate-activated channels of mouse central neurones in magnesium-free solutions. *J. Physiol. (Lond.)* **399**, 207-226.
- Ascher, P. & Nowak, L. (1988). The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J. Physiol. (Lond.)* **399**, 247-266.
- Attwell, D., Barbour, B. & Szatkowski, M. (1993). Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* **11**, 401-407.
- Barbour, B., Keller, B. U., Llano, I. & Marty, A. (1994). Prolonged presence of glutamate during excitatory synaptic transmission to cerebellar Purkinje cells. *Neuron* **12**, 1331-1343.
- Barnes, J. M. & Henley, J. M. (1992). Molecular characteristics of excitatory amino acid receptors. *Prog. Neurobiol.* **39**, 113-133.
- Baskys, A. & Malenka, R. C. (1991). Agonists at metabotropic glutamate receptors presynaptically inhibit EPSCs in neonatal rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* **444**, 687-701.
- Bender, A. S., Reichelt, W. & Norenberg, M. D. (2000). Characterization of cystine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem. Int.* **37**, 269-276.
- Benes, F. M. (1999). Evidence for altered trisynaptic circuitry in schizophrenic hippocampus. *Biol. Psychiatry* **46**, 589-599.
- Benes, F. M. (2000). Emerging principles of altered neural circuitry in schizophrenia. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **31**, 251-269.
- Benes, F. M. & Berretta, S. (2000). Amygdalo-entorhinal inputs to the hippocampal formation in relation to schizophrenia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **911**, 293-304.
- Bergles, D. E., Dzubay, J. A. & Jahr, C. E. (1997). Glutamate transporter currents in bergmann glial cells follow the time course of extrasynaptic glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **94**, 14821-14825.
- Bergles, D. E. & Jahr, C. E. (1998). Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *J. Neurosci.* **18**, 7709-7716.
- Blanton, M. G., Lo Turco, J. J. & Kriegstein, A. R. (1989). Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J. Neurosci. Methods* **30**, 203-210.

- Borde, M., Bonansco, C. & Buno, W. (1999). The activity-dependent potentiation of the slow Ca^{2+} -activated K^{+} current regulates synaptic efficacy in rat CA1 pyramidal neurons. *Pflügers Arch.* **437**, 261-266.
- Borde, M., Bonansco, C., Fernandez, d. S., Le Ray, D. & Buno, W. (2000). Voltage-clamp analysis of the potentiation of the slow Ca^{2+} -activated K^{+} current in hippocampal pyramidal neurons. *Hippocampus* **10**, 198-206.
- Borges, K. & Dingledine, R. (1998). AMPA receptors: molecular and functional diversity. *Prog. Brain Res.* **116**, 153-170.
- Bortolotto, Z. A. & Collingridge, G. L. (1998). Involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in the setting of a molecular switch involved in hippocampal LTP. *Neuropharmacology* **37**, 535-544.
- Braak, H. & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. Berl.* **82**, 239-259.
- Braak, H. & Braak, E. (2000). Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J. Neurol.* **247 Suppl 2**, II3-10.
- Braak, H., Del Tredici, K., Bohl, J., Bratzke, H. & Braak, E. (2000). Pathological changes in the parahippocampal region in select non- Alzheimer's dementias. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **911**, 221-239.
- Brookes, N. (2000). Functional integration of the transport of ammonium, glutamate and glutamine in astrocytes. *Neurochem. Int.* **37**, 121-129.
- Brown, A. M. & Birnbaumer, L. (1990). Ionic channels and their regulation by G protein subunits. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 197-213.
- Buller, A. L. & Monaghan, D. T. (1997). Pharmacological heterogeneity of NMDA receptors: Characterization of NR1a/NR2D heteromers expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **320**, 87-94.
- Burke, J. P. & Hablitz, J. J. (1995). Modulation of epileptiform activity by metabotropic glutamate receptors in immature rat neocortex. *J. Neurophysiol.* **73**, 205-217.
- Burwell, R. D. (2000). The parahippocampal region: corticocortical connectivity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **911**, 25-42.

- Carbone, E. & Swandulla, D. (1989). Neuronal calcium channels: Kinetics, blockade and modulation. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **54**, 31-58.
- Carlsson, A., Waters, N., Waters, S. & Carlsson, M. L. (2000). Network interactions in schizophrenia. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **31**, 342-349.
- Carlsson, M. & Carlsson, A. (1990). Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia--implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* **13**, 272-276.
- Castillo, P. E., Weisskopf, M. G. & Nicoll, R. A. (1994). The role of Ca^{2+} channels in hippocampal mossy fiber synaptic transmission and long-term potentiation. *Neuron* **12**, 261-269.
- Castrén, E., Da Penha Berzaghi, M., Lindholm, D. & Thoenen, H. (1993). Differential effects of MK-801 on brain-derived neurotrophic factor mRNA levels in different regions of the rat brain. *Exp. Neurol.* **122**, 244-252.
- Charpak, S., Gähwiler, B. H., Do, K. Q. & Knopfel, T. (1990). Potassium conductances in hippocampal neurons blocked by excitatory amino-acid transmitters. *Nature* **347**, 765-767.
- Chaudhry, F. A., Lehre, K. P., van Lookeren, C. M., Ottersen, O. P., Danbolt, N. C. & Storm-Mathisen, J. (1995). Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* **15**, 711-720.
- Chaudhry, F. A., Reimer, R. J., Krizaj, D., Barber, D., Storm-Mathisen, J., Copenhagen, D. R. & Edwards, R. H. (1999). Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* **99**, 769-780.
- Chittajallu, R., Vignes, M., Dev, K. K., Barnes, J. M., Collingridge, G. L. & Henley, J. M. (1996). Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus. *Nature* **379**, 78-81.
- Choi, S. & Lovinger, D. M. (1996). Metabotropic glutamate receptor modulation of voltage-gated Ca^{2+} channels involves multiple receptor subtypes in cortical neurons. *J. Neurosci.* **16**, 36-45.
- Chrobak, J. J., Lorincz, A. & Buzsaki, G. (2000). Physiological patterns in the hippocampo-entorhinal cortex system [In Process Citation]. *Hippocampus* **10**, 457-465.

Clark, K. A., Randall, A. D. & Collingridge, G. L. (1994). A comparison of paired-pulsed facilitation of AMPA and NMDA receptor-mediated excitatory postsynaptic currents in the hippocampus. *Exp. Brain Res.* **101**, 272-278.

Clements, J. D. (1996). Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci.* **19**, 163-171.

Cochilla, A. J. & Alford, S. (1998). Metabotropic glutamate receptor-mediated control of neurotransmitter release. *Neuron* **20**, 1007-1016.

Coco, S., Verderio, C., Trotti, D., Rothstein, J. D., Volterra, A. & Matteoli, M. (1997). Non-synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 in cultured hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 1902-1910.

Cohen, A. S., Coussens, C. M., Raymond, C. R. & Abraham, W. C. (1999). Long-lasting increase in cellular excitability associated with the priming of LTP induction in rat hippocampus. *J. Neurophysiol.* **82**, 3139-3148.

Collingridge, G. L. & Lester, R. A. (1989). Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol. Rev.* **41**, 143-210.

Collingridge, G. L. & Singer, W. (1990). Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 290-296.

Conn, P. J. & Pin, J. P. (1997). Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 205-237.

Conti, F., DeBiasi, S., Minelli, A., Rothstein, J. D. & Melone, M. (1998). EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cereb. Cortex* **8**, 108-116.

Conti, F. & Weinberg, R. J. (1999). Shaping excitation at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci.* **22**, 451-458.

Cooper, E. C., Milroy, A., Jan, Y. N., Jan, L. Y. & Lowenstein, D. H. (1998). Presynaptic localization of Kv1.4-containing A-type potassium channels near excitatory synapses in the hippocampus. *J. Neurosci.* **18**, 965-974.

Dale, H. H., Feldberg, W. & Vogt, M. (1936). Release of acetylcholine at voluntary nerve endings. *J. Physiol. (Lond)* **86**, 353-380.

Danbolt, N. C. (1994). The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog. Neurobiol.* **44**, 377-396.

Das, S., Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Takasu, M., Crandall, J. E., Dikkes, P., Conner, D. A., Rayudu, P. V., Cheung, W., Chen, H. S., Lipton, S. A. & Nakanishi, N. (1998). Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature* **393**, 377-381.

Davies, C. H., Clarke, V. R., Jane, D. E. & Collingridge, G. L. (1995). Pharmacology of postsynaptic metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *Br. J. Pharmacol.* **116**, 1859-1869.

Deller, T., Martínez, A., Nitsch, R. & Frotscher, M. (1996). A novel entorhinal projection to the rat dentate gyrus: Direct innervation of proximal dendrites and cell bodies of granule cells and GABAergic neurons. *J. Neurosci.* **16**, 3322-3333.

Desai, M. A. & Conn, P. J. (1991). Excitatory effects of ACPD receptor activation in the hippocampus are mediated by direct effects on pyramidal cells and blockade of synaptic inhibition. *J. Neurophysiol.* **66**, 40-52.

Diamond, J. S. & Jahr, C. E. (1997). Transporters buffer synaptically released glutamate on a submillisecond time scale. *J. Neurosci.* **17**, 4672-4687.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. & Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **51**, 7-61.

Dolorfo, C. L. & Amaral, D. G. (1998). Entorhinal cortex of the rat: Organization of intrinsic connections. *J. Comp. Neurol.* **398**, 49-82.

Du, F., Eid, T., Lothman, E. W., Köhler, C. & Schwarcz, R. (1995). Preferential neuronal loss in layer III of the medial entorhinal cortex in rat models of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* **15**, 6301-6313.

Dube, G. R. & Marshall, K. C. (1997). Modulation of excitatory synaptic transmission in locus coeruleus by multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Neuroscience* **80**, 511-521.

Eliasof, S., Arriza, J. L., Leighton, B. H., Kavanaugh, M. P. & Amara, S. G. (1998). Excitatory amino acid transporters of the salamander retina: identification, localization, and function. *J. Neurosci.* **18**, 698-712.

- Fairman, W. A., Sonders, M. S., Murdoch, G. H. & Amara, S. G. (1998). Arachidonic acid elicits a substrate-gated proton current associated with the glutamate transporter EAAT4. *Nat. Neurosci.* **1**, 105-113.
- Fairman, W. A., Vandenberg, R. J., Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P. & Amara, S. G. (1995). An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* **375**, 599-603.
- Farber, N. B., Price, M. T., Labruyere, J., Nemnich, J., St Peter, H., Wozniak, D. F. & Olney, J. W. (1993). Antipsychotic drugs block phencyclidine receptor-mediated neurotoxicity [see comments]. *Biol. Psychiatry* **34**, 119-121.
- Feldmeyer, D., Kask, K., Brusa, R., Kornau, H. C., Kolhekar, R., Rozov, A., Burnashev, N., Jensen, V., Hvalby, O., Sprengel, R. & Seeburg, P. H. (1999). Neurological dysfunctions in mice expressing different levels of the Q/R site-unedited AMPAR subunit GluR-B. *Nat. Neurosci.* **2**, 57-64.
- Flicker, C., Ferris, S. H. & Reisberg, B. (1991). Mild cognitive impairment in the elderly: predictors of dementia. *Neurology* **41**, 1006-1009.
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* **42**, 1-11.
- Furuta, A., Rothstein, J. D. & Martin, L. J. (1997). Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* **17**, 8363-8375.
- Gegelashvili, G. & Schousboe, A. (1997). High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol. Pharmacol.* **52**, 6-15.
- Gegelashvili, G. & Schousboe, A. (1998). Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Res. Bull.* **45**, 233-238.
- Gerber, U., Sim, J. A. & Gähwiler, B. H. (1992). Reduction of potassium conductances mediated by metabotropic glutamate receptors in rat CA3 pyramidal cells does not require protein kinase C or protein kinase A. *Eur. J. Neurosci.* **4**, 792-797.
- Gereau, R. W. & Conn, P. J. (1995a). Roles of specific metabotropic glutamate receptor subtypes in regulation of hippocampal CA1 pyramidal cell excitability. *J. Neurophysiol.* **74**, 122-129.
- Gereau, R. W. & Conn, P. J. (1995b). Multiple presynaptic metabotropic glutamate receptors modulate excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* **15**, 6879-6889.

Gloveli, T., Dugladze, T., Schmitz, D. & Heinemann, U. Properties of the entorhinal cortex deep layer neurons projecting to the rat dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.* 2000. In Press

Gloveli, T., Schmitz, D., Empson, R. M. & Heinemann, U. (1997a). Frequency-dependent information flow from the entorhinal cortex to the hippocampus. *J. Neurophysiol.* **78**, 3444-3449.

Gloveli, T., Iserhot, C., Schmitz, D., Castren, E., Behr, J. & Heinemann, U. (1997b). Systemic administration of the phencyclidine compound MK-801 affects stimulus-induced field potentials selectively in layer III of rat medial entorhinal cortex. *Neurosci. Lett.* **221**, 93-96.

Gloveli, T., Schmitz, D., Empson, R. M., Dugladze, T. & Heinemann, U. (1997c). Morphological and electrophysiological characterization of layer III cells of the medial entorhinal cortex of the rat. *Neuroscience* **77**, 629-648.

Gundersen, V., Danbolt, N. C., Ottersen, O. P. & Storm-Mathisen, J. (1993). Demonstration of glutamate/aspartate uptake activity in nerve endings by use of antibodies recognizing exogenous D-aspartate. *Neuroscience* **57**, 97-111.

Gundersen, V., Ottersen, O. P. & Storm-Mathisen, J. (1996). Selective excitatory amino acid uptake in glutamatergic nerve terminals and in glia in the rat striatum: quantitative electron microscopic immunocytochemistry of exogenous (D)-aspartate and endogenous glutamate and GABA. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 758-765.

Hamill, O. P., Bormann, J. & Sakmann, B. (1983). Activation of multiple-conductance state chloride channels in spinal neurones by glycine and GABA. *Nature* **305**, 805-808.

Hediger, M. A. & Welbourne, T. C. (1999). Introduction: glutamate transport, metabolism, and physiological responses. *Am. J. Physiol* **277**, F477-F480.

Hestrin, S., Sah, P. & Nicoll, R. A. (1990). Mechanisms generating the time course of dual component excitatory synaptic currents recorded in hippocampal slices. *Neuron* **5**, 247-253.

Hollmann, M. & Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 31-108.

Huang, L., Rowan, M. J. & Anwyl, R. (1999a). Induction of long-lasting depression by (+)-alpha-methyl-4- carboxyphenylglycine and other group II mGlu receptor ligands in the dentate gyrus of the hippocampus in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **366**, 151-158.

Huang, L., Killbride, J., Rowan, M. J. & Anwyl, R. (1999b). Activation of mGluRII induces LTD via activation of protein kinase A and protein kinase C in the dentate gyrus of the hippocampus in vitro. *Neuropharmacology* **38**, 73-83.

- Hülsmann, S., Oku, Y., Zhang, W. & Richter, D. W. (2000). Metabolic coupling between glia and neurons is necessary for maintaining respiratory activity in transverse medullary slices of neonatal mouse. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 856-862.
- Ikeda, S. R., Lovinger, D. M., McCool, B. A. & Lewis, D. L. (1995). Heterologous expression of metabotropic glutamate receptors in adult rat sympathetic neurons: subtype-specific coupling to ion channels. *Neuron* **14**, 1029-1038.
- Insausti, R., Belichenko, P. V., Frotscher, M., Matus, A., Monyer, H., Palm, G. & Steinhäuser, C. (1993). Plasticity in the entorhinal-hippocampal system. *Hippocampus* **3 Suppl.**, 289-292.
- Isaacson, J. S. & Nicoll, R. A. (1993). The uptake inhibitor L-trans-PDC enhances responses to glutamate but fails to alter the kinetics of excitatory synaptic currents in the hippocampus. *J. Neurophysiol.* **70**, 2187-2191.
- Iwama, T., Nagai, Y., Tamura, N., Harada, S. & Nagaoka, A. (1991). A novel glutamate agonist, TAN-950 A, isolated from streptomycetes. *Eur. J. Pharmacol.* **197**, 187-192.
- Jabaudon, D., Scanziani, M., Gähwiler, B. H. & Gerber, U. (2000). Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **97**, 5610-5615.
- Jonas, P. & Burnashev, N. (1995). Molecular mechanisms controlling calcium entry through AMPA-type glutamate receptor channels. *Neuron* **15**, 987-990.
- Jonas, P., Racca, C., Sakmann, B., Seeburg, P. H. & Monyer, H. (1994). Differences in Ca^{2+} permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron* **12**, 1281-1289.
- Jones, R. S. G. (1993). Entorhinal-hippocampal connections: A speculative view of their function. *Trends Neurosci.* **16**, 58-64.
- Jones, R. S. G. & Heinemann, U. (1988). Synaptic and intrinsic responses of medial entorhinal cortical cells in normal and magnesium-free medium in vitro. *J. Neurophysiol.* **59**, 1476-1497.
- Kamiya, H., Shinozaki, H. & Yamamoto, C. (1996). Activation of metabotropic glutamate receptor type 2/3 suppresses transmission at rat hippocampal mossy fibre synapses. *J. Physiol. (Lond)* **493 (Pt 2)**, 447-455.
- Kamiya, H. & Yamamoto, C. (1997). Phorbol ester and forskolin suppress the presynaptic inhibitory action of group-II metabotropic glutamate receptor at rat hippocampal mossy fibre synapse. *Neuroscience* **80**, 89-94.

Kanai, Y. & Hediger, M. A. (1992). Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter [see comments]. *Nature* **360**, 467-471.

Kanai, Y., Stelzner, M., Nussberger, S., Khawaja, S., Hebert, S. C., Smith, C. P. & Hediger, M. A. (1994). The neuronal and epithelial human high affinity glutamate transporter. Insights into structure and mechanism of transport. *J. Biol. Chem.* **269**, 20599-20606.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessel, T. M. (2000). *Principles of Neural Science*, 4 ed. McGraw-Hill.

Kataoka, Y., Morii, H., Watanabe, Y. & Ohmori, H. (1997). A postsynaptic excitatory amino acid transporter with chloride conductance functionally regulated by neuronal activity in cerebellar Purkinje cells. *J. Neurosci.* **17**, 7017-7024.

Keele, N. B., Arvanov, V., Holmes, K. & Shinnick-Gallagher, P. (1995). Agonist action of (RS)-alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG) in the amygdala. *NeuroReport* **6**, 1058-1062.

Keller, J. N., Pang, Z., Geddes, J. W., Begley, J. G., Germeyer, A., Waeg, G. & Mattson, M. P. (1997a). Impairment of glucose and glutamate transport and induction of mitochondrial oxidative stress and dysfunction in synaptosomes by amyloid beta-peptide: role of the lipid peroxidation product 4- hydroxynonenal. *J. Neurochem.* **69**, 273-284.

Keller, J. N., Mark, R. J., Bruce, A. J., Blanc, E., Rothstein, J. D., Uchida, K., Waeg, G. & Mattson, M. P. (1997b). 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes. *Neuroscience* **80**, 685-696.

Kidd, F. L. & Isaac, J. T. (2000). Glutamate transport blockade has a differential effect on AMPA and NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the developing barrel cortex. *Neuropharmacology* **39**, 725-732.

Kimura, F., Otsu, Y. & Tsumoto, T. (1997). Presynaptically silent synapses: spontaneously active terminals without stimulus-evoked release demonstrated in cortical autapses. *J. Neurophysiol.* **77**, 2805-2815.

Kinney, G. A., Overstreet, L. S. & Slater, N. T. (1997). Prolonged physiological entrapment of glutamate in the synaptic cleft of cerebellar unipolar brush cells. *J. Neurophysiol.* **78**, 1320-1333.

Köhler, C. (1986). Intrinsic connections of the retrohippocampal region in the rat brain. II. The medial entorhinal area. *J. Comp. Neurol.* **246**, 149-169.

- Kuhse, J., Betz, H. & Kirsch, J. (1995). The inhibitory glycine receptor: architecture, synaptic localization and molecular pathology of a postsynaptic ion-channel complex. *Curr. Opin. Neurobiol.* **5**, 318-323.
- Kullmann, D. M. & Asztely, F. (1998). Extrasynaptic glutamate spillover in the hippocampus: evidence and implications. *Trends Neurosci.* **21**, 8-14.
- Laube, B., Kuhse, J. & Betz, H. (1998). Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J. Neurosci.* **18**, 2954-2961.
- Lehre, K. P., Levy, L. M., Ottersen, O. P., Storm-Mathisen, J. & Danbolt, N. C. (1995). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* **15**, 1835-1853.
- Lester, H. A., Cao, Y. & Mager, S. (1996). Listening to neurotransmitter transporters. *Neuron* **17**, 807-810.
- Lindén, A. M., Väsänen, J., Wong, G. & Castrén, E. (1997). NMDA receptor 2C subunit is selectively decreased by MK-801 in the entorhinal cortex. *Eur. J. Pharmacol.* **319**, R1-R2.
- Loewi, O. (1921). Über humorale Übertragung der Herznervenwirkung. *Pflügers Arch.* **189**, 239-242.
- Lovinger, D. M. (1991). *Trans*-1-aminocyclopentane-1,3-dicarboxylic acid (*t*-ACPD) decreases synaptic excitation in rat striatal slices through a presynaptic action. *Neurosci. Lett.* **129**, 17-21.
- Lovinger, D. M., Tyler, E., Fidler, S. & Merritt, A. (1993). Properties of a presynaptic metabotropic glutamate receptor in rat neostriatal slices. *J. Neurophysiol.* **69**, 1236-1244.
- Ludolph, A. C., Meyer, T., Riepe, M. & Völkel, H. (1998). Amyotrophic lateral sclerosis and glutamate. *Restorative Neurology and Neuroscience* **13**, 59-67.
- Maccaferri, G., Tóth, K. & McBain, C. J. (1998). Target-specific expression of presynaptic mossy fiber plasticity. *Science* **279**, 1368-1370.
- MacDermott, A. B. & Dale, N. (1987). Receptors, ion channels and synaptic potentials underlying the integrative actions of excitatory amino acids. *Trends Neurosci.* **10**, 280-284.
- MacDermott, A. B., Mayer, M. L., Westbrook, G. L., Smith, S. J. & Barker, J. L. (1986). NMDA-receptor activation increases cytoplasmic calcium concentration in cultured spinal cord neurones. *Nature* **321**, 519-522.

- Maki, R., Robinson, M. B. & Dichter, M. A. (1994). The glutamate uptake inhibitor L-*trans*-pyrrolidine-2,4-dicarboxylate depresses excitatory synaptic transmission via a presynaptic mechanism in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **14**, 6754-6762.
- Malgaroli, A. & Tsien, R. W. (1992). Glutamate-induced long-term potentiation of the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons. *Nature* **357**, 134-139.
- Manabe, T., Renner, P. & Nicoll, R. A. (1992). Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Nature* **355**, 50-55.
- Manahan-Vaughan, D. (1997). Group 1 and 2 metabotropic glutamate receptors play differential roles in hippocampal long-term depression and long-term potentiation in freely moving rats. *J. Neurosci.* **17**, 3303-3311.
- Manahan-Vaughan, D., Herrero, I., Reymann, K. G. & Sanchez-Prieto, J. (1999). Presynaptic group 1 metabotropic glutamate receptors may contribute to the expression of long-term potentiation in the hippocampal CA1 region [published erratum appears in *Neuroscience* 2000;97(1):205]. *Neuroscience* **94**, 71-82.
- Manfras, B. J., Rudert, W. A., Trucco, M. & Boehm, B. O. (1994). Cloning and characterization of a glutamate transporter cDNA from human brain and pancreas. *Biochim. Biophys. Acta* **1195**, 185-188.
- Manzoni, O. & Bockaert, J. (1995). Metabotropic glutamate receptors inhibiting excitatory synapses in the CA1 area of rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* **7**, 2518-2523.
- Manzoni, O., Michel, J. M. & Bockaert, J. (1997). Metabotropic glutamate receptors in the rat nucleus accumbens. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 1514-1523.
- Mason, D. J., Suva, L. J., Genever, P. G., Patton, A. J., Steuckle, S., Hillam, R. A. & Skerry, T. M. (1997). Mechanically regulated expression of a neural glutamate transporter in bone: a role for excitatory amino acids as osteotropic agents? *Bone* **20**, 199-205.
- Mayer, M. L. (1985). A calcium-activated chloride current generates the after hyperpolarization of rat sensory neurones in culture. *J. Physiol. (Lond.)* **364**, 217-240.
- Mayer, M. L. & Westbrook, G. L. (1987). The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **28**, 197-276.
- Mayer, M. L., Westbrook, G. L. & Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* **309**, 261-263.

- McCaffery, B., Cho, K., Bortolotto, Z. A., Aggleton, J. P., Brown, M. W., Conquet, F., Collingridge, G. L. & Bashir, Z. I. (1999). Synaptic depression induced by pharmacological activation of metabotropic glutamate receptors in the perirhinal cortex in vitro. *Neuroscience* **93**, 977-984.
- McCormick, D. A. (1998). Membrane properties and neurotransmitter actions. In *The Synaptic Organization of the Brain*, ed. Shepherd, G. M., pp. 37-75. Oxford University Press, Inc., New York.
- McDonald, J. W. & Johnston, M. V. (1990). Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **15**, 41-70.
- McLennan, H. (1983). Receptors for the excitatory amino acids in the mammalian central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **20**, 251-271.
- Medina, L., Figueredo-Cardenas, G., Rothstein, J. D. & Reiner, A. (1996). Differential abundance of glutamate transporter subtypes in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-vulnerable versus ALS-resistant brain stem motor cell groups. *Exp. Neurol.* **142**, 287-295.
- Meister, A. & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711-760.
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J. Nutr.* **130**, 1007S-1015S.
- Meldrum, B. S., Akbar, M. T. & Chapman, A. G. (1999). Glutamate receptors and transporters in genetic and acquired models of epilepsy. *Epilepsy Research* **36**, 189-204.
- Mennerick, S., Shen, W., Xu, W., Benz, A., Tanaka, K., Shimamoto, K., Isenberg, K. E., Krause, J. E. & Zorumski, C. F. (1999). Substrate turnover by transporters curtails synaptic glutamate transients. *J. Neurosci.* **19**, 9242-9251.
- Mennerick, S. & Zorumski, C. F. (1994). Glial contributions to excitatory neurotransmission in cultured hippocampal cells. *Nature* **368**, 59-62.
- Mennerick, S. & Zorumski, C. F. (1995). Presynaptic influence on the time course of fast excitatory synaptic currents in cultured hippocampal cells. *J. Neurosci.* **15**, 3178-3192.
- Miller, H. P., Levey, A. I., Rothstein, J. D., Tzingounis, A. V. & Conn, P. J. (1997). Alterations in glutamate transporter protein levels in kindling-induced epilepsy. *J. Neurochem.* **68**, 1564-1570.

- Miller, S., Bridges, R. J., Chamberlin, A. R. & Cotman, C. W. (1994). Pharmacological dissociation of glutamatergic metabotropic signal transduction pathways in cortical astrocytes. *Eur. J. Pharmacol.* **269**, 235-241.
- Milton, I. D., Banner, S. J., Ince, P. G., Piggott, N. H., Fray, A. E., Thatcher, N., Horne, C. H. & Shaw, P. J. (1997). Expression of the glial glutamate transporter EAAT2 in the human CNS: an immunohistochemical study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **52**, 17-31.
- Min, M. Y., Rusakov, D. A. & Kullmann, D. M. (1998). Activation of AMPA, kainate, and metabotropic receptors at hippocampal mossy fiber synapses: role of glutamate diffusion. *Neuron* **21**, 561-570.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B. & Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**, 529-540.
- Moroni, F., Cozzi, A., Lombardi, G., Sourtcheva, S., Leonardi, P., Carfi, M. & Pellicciari, R. (1998). Presynaptic mGlu1 type receptors potentiate transmitter output in the rat cortex. *Eur. J. Pharmacol.* **347**, 189-195.
- Murphy, T. H., Schnaar, R. L. & Coyle, J. T. (1990). Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. *FASEB J.* **4**, 1624-1633.
- Müller, W., Misgeld, U. & Heinemann, U. (1988). Carbachol effects on hippocampal neurons in vitro: dependence on the rate of rise of carbachol tissue concentration. *Exp. Brain Res.* **72**, 287-298.
- Nakanishi, S., Nakajima, Y., Masu, M., Ueda, Y., Nakahara, K., Watanabe, D., Yamaguchi, S., Kawabata, S. & Okada, M. (1998). Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **26**, 230-235.
- Nouranifar, R., Blitzer, R. D., Wong, T. & Landau, E. (1998). Metabotropic glutamate receptors limit adenylyl cyclase-mediated effects in rat hippocampus via protein kinase C. *Neurosci. Lett.* **244**, 101-105.
- Olney, J. W. (1990). Excitotoxic amino acids and neuropsychiatric disorders. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **30**, 47-71.
- Olney, J. W. & Farber, N. B. (1995). Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* **52**, 998-1007.
- Olney, J. W., Labruyere, J., Wang, G., Wozniak, D. F., Price, M. T. & Sesma, M. A. (1991). NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* **254**, 1515-1518.

- Olney, J. W., Newcomer, J. W. & Farber, N. B. (1999). NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* **33**, 523-533.
- Otis, T. S. & Jahr, C. E. (1998). Anion currents and predicted glutamate flux through a neuronal glutamate transporter. *J. Neurosci.* **18**, 7099-7110.
- Otis, T. S., Kavanaugh, M. P. & Jahr, C. E. (1997). Postsynaptic glutamate transport at the climbing fiber-Purkinje cell synapse. *Science* **277**, 1515-1518.
- Otis, T. S., Wu, Y. C. & Trussell, L. O. (1996). Delayed clearance of transmitter and the role of glutamate transporters at synapses with multiple release sites. *J. Neurosci.* **16**, 1634-1644.
- Ottersen, O. P., Zhang, N. & Walberg, F. (1992). Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience* **46**, 519-534.
- Overstreet, L. S., Kinney, G. A., Liu, Y. B., Billups, D. & Slater, N. T. (1999). Glutamate transporters contribute to the time course of synaptic transmission in cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* **19**, 9663-9673.
- Pannicke, T., Stabel, J., Heinemann, U. & Reichelt, W. (1994). α -Aminoadipic acid blocks the Na(+)-dependent glutamate transport into acutely isolated Muller glial cells from guinea pig retina. *Pflügers Arch.* **429**, 140-142.
- Partridge, L. D. & Swandulla, D. (1988). Calcium-activated non-specific cation channels. *Trends Neurosci.* **11**, 69-72.
- Pastorini, R. S., Di Luca, M., Sciuto, A., Gardoni, F. & Cattabeni, F. MCPG induces PKC ϵ translocation in rat cortical synaptosomes through PLD activation. *Forum Eur. Neurosci.* 125. 1998. Abstract
- Pastorino, L., Colciaghi, F., Gardoni, F., Albani-Torregrossa, S., Pellegrini-Giampietro, D. E., Moroni, F., De Graan, P. N., Cattabeni, F. & Di Luca, M. (2000). (+)-MCPG induces PKC ϵ translocation in cortical synaptosomes through a PLD-coupled mGluR. *Eur. J. Neurosci.* **12**, 1310-1318.
- Pedarzani, P. & Storm, J. F. (1996a). Evidence that Ca/calmodulin-dependent protein kinase mediates the modulation of the Ca²⁺-dependent K⁺ current, I_{AHP}, by acetylcholine, but not by glutamate, in hippocampal neurons. *Pflügers Arch.* **431**, 723-728.
- Pedarzani, P. & Storm, J. F. (1996b). Interaction between α - and β -adrenergic receptor agonists modulating the slow Ca²⁺-activated K⁺ current I_{AHP} in hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 2098-2110.

- Peghini, P., Janzen, J. & Stoffel, W. (1997). Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO J.* **16**, 3822-3832.
- Pellegrini-Giampietro, D. E., Torregrossa, S. A. & Moroni, F. (1996). Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors coupled to phospholipase D in the rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 1035-1043.
- Perkinton, M. S. & Sihra, T. S. (1999). A high-affinity presynaptic kainate-type glutamate receptor facilitates glutamate exocytosis from cerebral cortex nerve terminals (synaptosomes). *Neuroscience* **90**, 1281-1292.
- Petralia, R. S., Wang, Y. X., Niedzielski, A. S. & Wenthold, R. J. (1996). The metabotropic glutamate receptors, mGluR2 and mGluR3, show unique postsynaptic, presynaptic and glial localizations. *Neuroscience* **71**, 949-976.
- Pines, G., Danbolt, N. C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm-Mathisen, J., Seeberg, E. & Kanner, B. I. (1992). Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter [published erratum appears in *Nature* 1992 Dec 24-31;360(6406):768] [see comments]. *Nature* **360**, 464-467.
- Pisani, A., Calabresi, P., Centonze, D. & Bernardi, G. (1997). Activation of group III metabotropic glutamate receptors depresses glutamatergic transmission at corticostriatal synapse. *Neuropharmacology* **36**, 845-851.
- Plaitakis, A. & Shashidharan, P. (2000). Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neurol.* **247 Suppl 2**, II25-II35.
- Rainnie, D. G. & Shinnick-Gallagher, P. (1992). Trans-ACPD and L-APB presynaptically inhibit excitatory glutamatergic transmission in the basolateral amygdala (BLA). *Neurosci. Lett.* **139**, 87-91.
- Redman, S. (1990). Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system. *Physiol. Rev.* **70**, 165-198.
- Reichelt, W., Stabel-Burow, J., Pannicke, T., Weichert, H. & Heinemann, U. (1997). The glutathione level of retinal Muller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate. *Neuroscience* **77**, 1213-1224.
- Reid, M. E., Toms, N. J., Bedingfield, J. S. & Roberts, P. J. (1999). Group I mGlu receptors potentiate synaptosomal [3H]glutamate release independently of exogenously applied arachidonic acid. *Neuropharmacology* **38**, 477-485.

- Robinson, M. B. (1998). Examination of glutamate transporter heterogeneity using synaptosomal preparations. *Methods Enzymol.* **296**, 189-202.
- Robinson, M. B. (1999). The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem. Int.* **33**, 479-491.
- Robinson, M. B. & Dowd, L. A. (1997). Heterogeneity and functional properties of subtypes of sodium-dependent glutamate transporters in the mammalian central nervous system. *Adv. Pharmacol.* **37**, 69-115.
- Romano, C., Sesma, M. A., McDonald, C. T., O'Malley, K., van den Pol, A. N. & Olney, J. W. (1995). Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain. *J. Comp. Neurol.* **355**, 455-469.
- Rossi, D. J., Oshima, T. & Attwell, D. (2000). Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* **403**, 316-321.
- Rothstein, J. D., Martin, L., Levey, A. I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N. & Kuncl, R. W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* **13**, 713-725.
- Rothstein, J. D., Martin, L. J. & Kuncl, R. W. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis [see comments]. *N. Engl. J. Med.* **326**, 1464-1468.
- Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A. I., Martin, L. J. & Kuncl, R. W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **38**, 73-84.
- Rusakov, D. A. & Kullmann, D. M. (1998). Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation. *J. Neurosci.* **18**, 3158-3170.
- Ruth, R. E., Collier, T. J. & Routtenberg, A. (1982). Topography between the entorhinal cortex and the dentate septotemporal axis in rats: I. Medial and intermediate entorhinal projecting cells. *J. Comp. Neurol.* **209**, 69-78.
- Ruth, R. E., Collier, T. J. & Routtenberg, A. (1988). Topographical relationship between the entorhinal cortex and the septotemporal axis of the dentate gyrus in rats: II. Cells projecting from lateral entorhinal subdivisions. *J. Comp. Neurol.* **270**, 506-516.

- Sahara, Y. & Westbrook, G. L. (1993). Modulation of calcium currents by a metabotropic glutamate receptor involves fast and slow kinetic components in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci.* **13**, 3041-3050.
- Sarantis, M., Ballerini, L., Miller, B., Silver, R. A., Edwards, M. & Attwell, D. (1993). Glutamate uptake from the synaptic cleft does not shape the decay of the non-NMDA component of the synaptic current. *Neuron* **11**, 541-549.
- Scanziani, M., Capogna, M., Gähwiler, B. H. & Thompson, S. M. (1992). Presynaptic inhibition of miniature excitatory synaptic currents by baclofen and adenosine in the hippocampus. *Neuron* **9**, 919-927.
- Scanziani, M., Gähwiler, B. H. & Thompson, S. M. (1995). Presynaptic inhibition of excitatory synaptic transmission by muscarinic and metabotropic glutamate receptor activation in the hippocampus: are Ca^{2+} channels involved? *Neuropharmacology* **34**, 1549-1557.
- Scanziani, M., Salin, P. A., Vogt, K. E., Malenka, R. C. & Nicoll, R. A. (1997). Use-dependent increases in glutamate concentration activate presynaptic metabotropic glutamate receptors. *Nature* **385**, 630-634.
- Schmitz, D., Empson, R. M., Gloveli, T. & Heinemann, U. (1997). Serotonin blocks different pattern of low Mg^{2+} -induced epileptiform activity in rat entorhinal cortex, but not hippocampus. *Neuroscience* **76**, 449-458.
- Schmitz, D., Gloveli, T., Empson, R. M. & Heinemann, U. (1999). Potent depression of stimulus evoked field potential responses in the medial entorhinal cortex by serotonin. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 248-254.
- Schoepfer, R., Monyer, H., Sommer, B., Wisden, W., Sprengel, R., Kuner, T., Lomeli, H., Herb, A., Kohler, M. & Burnashev, N. (1994). Molecular biology of glutamate receptors. *Prog. Neurobiol.* **42**, 353-357.
- Schoepp, D. D. & Conn, P. J. (1993). Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 13-20.
- Schwartz, S. P. & Coleman, P. D. (1981). Neurons of origin of the perforant path. *Exp. Neurol.* **74**, 305-312.
- Scott, H. L., Tannenberg, A. E. & Dodd, P. R. (1995). Variant forms of neuronal glutamate transporter sites in Alzheimer's disease cerebral cortex. *J. Neurochem.* **64**, 2193-2202.

Seeburg, P. H. (1993). The TINS/TiPS Lecture. The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* **16**, 359-365.

Shafqat, S., Tamarappoo, B. K., Kilberg, M. S., Puranam, R. S., McNamara, J. O., Guadano-Ferraz, A. & Freneau, R. T., Jr. (1993). Cloning and expression of a novel Na⁺-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na⁺/glutamate cotransporters. *J. Biol. Chem.* **268**, 15351-15355.

Shashidharan, P., Huntley, G. W., Meyer, T., Morrison, J. H. & Plaitakis, A. (1994). Neuron-specific human glutamate transporter: molecular cloning, characterization and expression in human brain. *Brain Res.* **662**, 245-250.

Shashidharan, P., Huntley, G. W., Murray, J. M., Buku, A., Moran, T., Walsh, M. J., Morrison, J. H. & Plaitakis, A. (1997). Immunohistochemical localization of the neuron-specific glutamate transporter EAAC1 (EAAT3) in rat brain and spinal cord revealed by a novel monoclonal antibody. *Brain Res.* **773**, 139-148.

Shashidharan, P. & Plaitakis, A. (1993). Cloning and characterization of a glutamate transporter cDNA from human cerebellum. *Biochim. Biophys. Acta* **1216**, 161-164.

Sherrington, C. S. (1897). *Textbook of Physiology*, pp. 60.

Shibata, H. (1996). Direct projections from the entorhinal area to the anteroventral and laterodorsal thalamic nuclei in the rat. *Neurosci. Res.* **26**, 83-87.

Shimamoto, K., Lebrun, B., Yasuda-Kamatani, Y., Sakaitani, M., Shigeri, Y., Yumoto, N. & Nakajima, T. (1998). DL-threo- β -benzyloxyaspartate, a potent blocker of excitatory amino acid transporters. *Mol. Pharmacol.* **53**, 195-201.

Shimamoto, K., Shigeri, Y., Yasuda-Kamatani, Y., Lebrun, B., Yumoto, N. & Nakajima, T. (2000). Syntheses of optically pure beta-hydroxyaspartate derivatives as glutamate transporter blockers [In Process Citation]. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **10**, 2407-2410.

Shirasaki, T., Harata, N. & Akaike, N. (1994). Metabotropic glutamate response in acutely dissociated hippocampal CA1 pyramidal neurones of the rat. *J. Physiol. (Lond)* **475**, 439-453.

Sim, J. A., Gerber, U., Knopfel, T. & Brown, D. A. (1992). Evidence against a role for protein kinase C in the inhibition of the calcium-activated potassium current I_{AHP} by muscarinic stimulants in rat hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* **4**, 785-791.

Sims, K. D. & Robinson, M. B. (1999). Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Crit. Rev. Neurobiol.* **13**, 169-197.

- Sladeczek, F., Momiyama, A. & Takahashi, T. (1993). Presynaptic inhibitory action of a metabotropic glutamate receptor agonist on excitatory transmission in visual cortical neurons. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **253**, 297-303.
- Slotboom, D. J., Konings, W. N. & Lolkema, J. S. (1999). Structural features of the glutamate transporter family. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 293-307.
- Sonders, M. S. & Amara, S. G. (1996). Channels in transporters. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 294-302.
- Sonnewald, U., Westergaard, N. & Schousboe, A. (1997). Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia* **21**, 56-63.
- Sorensen, K. E. (1985). Projections of the entorhinal area to the striatum, nucleus accumbens, and cerebral cortex in the guinea pig. *J. Comp. Neurol.* **238**, 308-322.
- Stafstrom, C. E., Schwindt, P. C. & Crill, W. E. (1982). Negative slope conductance due to a persistent subthreshold sodium current in cat neocortical neurons in vitro. *Brain Res.* **236**, 221-226.
- Staubli, U. & Lynch, G. (1987). Stable hippocampal long-term potentiation elicited by 'theta' pattern stimulation. *Brain Res.* **435**, 227-234.
- Stenkamp, K., Heinemann, U. & Schmitz, D. (1998). Dopamine suppresses stimulus-induced field potentials in layer III of rat medial entorhinal cortex. *Neurosci. Lett.* **255**, 119-121.
- Storek, T., Schulte, S., Hofmann, K. & Stoffel, W. (1992). Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **89**, 10955-10959.
- Storm-Mathisen, J. & Ottersen, O. P. (1984). Neurotransmitter in the hippocampal formation. In *Cortical integration: basic, archicortical, cortical association*, eds. Reinoso-Suárez, F. & Ajmone-Marsan, C., pp. 105-130. Raven Press, New York.
- Suzuki, W. A. & Eichenbaum, H. (2000). The neurophysiology of memory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **911**, 175-191.
- Swanson, L. W. & Cowan, W. M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* **172**, 49-84.
- Swanson, R. A. (1992). Astrocyte glutamate uptake during chemical hypoxia in vitro. *Neurosci. Lett.* **147**, 143-146.

- Swartz, K. J. (1993). Modulation of Ca^{2+} channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G protein-mediated inhibition. *Neuron* **11**, 305-320.
- Szatkowski, M., Barbour, B. & Attwell, D. (1990). Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* **348**, 443-446.
- Takahashi, M., Kovalchuk, Y. & Attwell, D. (1995). Pre- and postsynaptic determinants of EPSC waveform at cerebellar climbing fiber and parallel fiber to Purkinje cell synapses. *J. Neurosci.* **15**, 5693-5702.
- Tanaka, K. (2000). Functions of glutamate transporters in the brain. *Neurosci.Res.* **37**, 15-19.
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., Okuyama, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M. & Wada, K. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* **276**, 1699-1702.
- Thierry, A. M., Gioanni, Y., Degenetais, E. & Glowinski, J. (2000). Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics [In Process Citation]. *Hippocampus* **10**, 411-419.
- Thomson, A. M., West, D. C. & Lodge, D. (1985). An N-methylaspartate receptor-mediated synapse in rat cerebral cortex: a site of action of ketamine? *Nature* **313**, 479-481.
- Tong, G. & Jahr, C. E. (1994). Block of glutamate transporters potentiates postsynaptic excitation. *Neuron* **13**, 1195-1203.
- Torp, R., Danbolt, N. C., Babaie, E., Bjoras, M., Seeberg, E., Storm-Mathisen, J. & Ottersen, O. P. (1994). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 936-942.
- Torp, R., Haug, F. M., Tonder, N., Zimmer, J. & Ottersen, O. P. (1992). Neuroactive amino acids in organotypic slice cultures of the rat hippocampus: an immunocytochemical study of the distribution of GABA, glutamate, glutamine and taurine. *Neuroscience* **46**, 807-823.
- Trombley, P. Q. & Westbrook, G. L. (1992). L-AP4 inhibits calcium currents and synaptic transmission via a G- protein-coupled glutamate receptor. *J. Neurosci.* **12**, 2043-2050.
- Tyler, E. C. & Lovinger, D. M. (1995). Metabotropic glutamate receptor modulation of synaptic transmission in corticostriatal co-cultures: role of calcium influx. *Neuropharmacology* **34**, 939-952.

- Van Den, B. L., Vandenberghe, W., Klaassen, H., Van Houtte, E. & Robberecht, W. (2000). Ca(2+)-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J. Neurol. Sci.* **180**, 29-34.
- Vandenberg, R. J. (1998). Molecular pharmacology and physiology of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **25**, 393-400.
- Velasco, I., Tapia, R. & Massieu, L. (1996). Inhibition of glutamate uptake induces progressive accumulation of extracellular glutamate and neuronal damage in rat cortical cultures. *J. Neurosci. Res.* **44**, 551-561.
- Vogt, K. E. & Nicoll, R. A. (1999). Glutamate and γ -aminobutyric acid mediate a heterosynaptic depression at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **96**, 1118-1122.
- Volterra, A., Bezzi, P., Rizzini, B. L., Trotti, D., Ullensvang, K., Danbolt, N. C. & Racagni, G. (1996). The competitive transport inhibitor L-trans-pyrrolidine-2, 4- dicarboxylate triggers excitotoxicity in rat cortical neuron-astrocyte co-cultures via glutamate release rather than uptake inhibition. *Eur. J. Neurosci.* **8**, 2019-2028.
- Wadiche, J. I., Amara, S. G. & Kavanaugh, M. P. (1995). Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. *Neuron* **15**, 721-728.
- Watase, K., Hashimoto, K., Kano, M., Yamada, K., Watanabe, M., Inoue, Y., Okuyama, S., Sakagawa, T., Ogawa, S., Kawashima, N., Hori, S., Takimoto, M., Wada, K. & Tanaka, K. (1998). Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur. J. Neurosci.* **10**, 976-988.
- Watkins, J. C. & Olverman, H. J. (1987). Agonists and antagonists for excitatory amino acid receptors. *Trends Neurosci.* **10**, 265-272.
- Werman, R. (1966). Criteria for identification of a central nervous system transmitter. *Comp. Biochem. Physiol.* **18**, 745-766.
- Westbrook, G. L. (1994). Glutamate receptor update. *Curr. Opin. Neurobiol.* **4**, 337-346.
- Winder, D. G., Ritch, P. S., Gereau, R. W. & Conn, P. J. (1996). Novel glial-neuronal signalling by coactivation of metabotropic glutamate and beta-adrenergic receptors in rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond)* **494 (Pt 3)**, 743-755.
- Witter, M. P. (1993). Organization of the entorhinal-hippocampal system: A review of current anatomical data. *Hippocampus* **3 Suppl.**, 33-44.

- Witter, M. P., Groenewegen, H. J., Da Silva, F. H. L. & Lohman, A. H. M. (1989). Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the parahippocampal region. *Prog. Neurobiol.* **33**, 161-253.
- Witter, M. P., Wouterlood, F. G., Naber, P. A. & van Haeften, T. (2000). Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **911**, 1-24.
- Wyllie, D. J., Manabe, T. & Nicoll, R. A. (1994). A rise in postsynaptic Ca^{2+} potentiates miniature excitatory postsynaptic currents and AMPA responses in hippocampal neurons. *Neuron* **12**, 127-138.
- Ye, Z. C., Rothstein, J. D. & Sontheimer, H. (1999). Compromised glutamate transport in human glioma cells: reduction- mislocalization of sodium-dependent glutamate transporters and enhanced activity of cystine-glutamate exchange. *J. Neurosci.* **19**, 10767-10777.
- Ye, Z. C. & Sontheimer, H. (1999). Metabotropic glutamate receptor agonists reduce glutamate release from cultured astrocytes. *Glia* **25**, 270-281.
- Zerangue, N. & Kavanaugh, M. P. (1996). Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* **383**, 634-637.
- Zorumski, C. F., Mennerick, S. & Que, J. (1996). Modulation of excitatory synaptic transmission by low concentrations of glutamate in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol. (Lond)* **494** (Pt 2), 465-477.

Liste eigener Veröffentlichungen

Gloveli, T., Iserhot, C., Schmitz, D., Castren, E., Behr, J. & Heinemann, U. (1997). Systemic administration of the phencyclidine compound MK-801 affects stimulus-induced field potentials selectively in layer III of rat medial entorhinal cortex. *Neurosci. Lett.* **221**, 93-96.

Iserhot, C., Gloveli, T., & Heinemann, U. (1999c). Effects of glutamate uptake blockers on stimulus-induced field potentials in rat entorhinal cortex *in vitro*. *Neurosci. Lett.* **259**, 103-106.

Iserhot, C., Gebhardt, C. & Heinemann, U. DL-TBOA and L-*trans*-2,4-PDC: negative feedback on glutamate release via different groups of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the medial entorhinal cortex of the rat. 2001. *in preparation*

Iserhot, C., Gloveli, T., Fink, H., & Heinemann, U. Effects of dihydrokainate and L-*trans*-pyrrolidine-2-4-dicarboxylate on excitatory synaptic currents in rat entorhinal cortex *in vitro*. Soc.Neurosci.Abstr. 25[Part 1], 428-428. 1999d. *Abstract*

Iserhot, C., Gloveli, T., & Heinemann, U. Effects of glutamate uptake blockers on stimulus-induced field potentials in rat entorhinal cortex *in vitro*. Pflug.Arch.Eur.J.Phys. 437 (Suppl.)[5], R124-R124. 1999a. *Abstract*

Iserhot, C., Gloveli, T., Schmitz, D., Stenkamp, K., & Heinemann, U. Effects of L-*trans*-2,4-PDC on excitatory synaptic currents in rat entorhinal cortex *in vitro*. Göttinger Neurobiologentagung . 1999b. *Abstract*

Vorträge

Dezember 1999; National Institutes of Health, Bethesda

"Effects of glutamate uptake blockers on excitatory synaptic currents in rat entorhinal cortex *in vitro*."